



UNIVERSITÉ DE
SHERBROOKE

Effets de l'âge sur les propriétés antioxydantes des lipoprotéines de haute densité (HDL)
et de l'enzyme paraoxonase 1(PON1): rôle dans le développement de l'athérosclérose.

Par

Leila Jaouad

Département de Physiologie - biophysique

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

en Physiologie - biophysique

Juillet 2005



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-17318-3

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-17318-3

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Résumé

Effets de l'âge sur les propriétés antioxydantes des lipoprotéines de haute densité (HDL) et de l'enzyme paraoxonase1 (PON1): rôle dans le développement de l'athérosclérose.

Par

Leila Jaouad

Département de Physiologie - biophysique

Université de Sherbrooke

La Paraoxonase1 (PON1) est une estérase / lactonase sérique synthétisée par le foie et exprimée exclusivement à la surface des lipoprotéines de haute densité (HDL). Cette protéine a été d'abord connue en toxicologie pour sa capacité à hydrolyser les composés organophosphorés. La PON1 joue aussi un rôle majeur dans la physiopathologie de l'athérosclérose. En effet, le rôle anti-athérogène des HDL qui se traduit par la protection des lipoprotéines de faible densité (LDL) de l'oxydation, serait dû à la capacité de l'enzyme PON1 à hydrolyser les acides gras polyinsaturés oxydés.

De nombreuses études ont montré une diminution de l'activité de l'enzyme PON1 dans les pathologies associées à l'athérosclérose (diabète, hypertension, hypercholestérolémie). Une étude menée dans notre laboratoire a démontré la diminution de l'activité paraoxonase au cours du vieillissement. Ce résultat suggère que la réduction de l'activité de l'enzyme PON1 pourrait affecter les propriétés anti-athérogènes des HDL.

Le but de cette étude est de déterminer l'effet des modifications oxydatives des HDL sur l'activité enzymatique de la PON1 et d'étudier l'effet de l'âge sur les propriétés antioxydantes des HDL et de l'enzyme PON1.

Nous avons recruté des sujets âgés de 18 à 25 ans pour le groupe jeune et des sujets âgés de 65 ans et plus pour le groupe âgé. Nous avons ensuite procédé à l'oxydation des HDL provenant des sujets jeunes et à l'évaluation des marqueurs de la peroxydation lipidique en parallèle avec la mesure de l'activité paraoxonase. Les résultats obtenus montrent une corrélation positive et significative entre le potentiel antioxydant des HDL et l'activité paraoxonase de l'enzyme PON1.

Nos résultats démontrent, et ce pour la première fois, que les HDL des sujets âgés possèdent un potentiel antioxydant plus faible comparé avec les HDL des sujets jeunes.

De plus, l'oxydation de l'enzyme paraoxonase1 purifiée, abolie le groupement thiols de la cystéine en position 284 ainsi que son activité antioxydante. Ce qui met en évidence le rôle important de ce groupement dans l'activité anti-athérogène de la PON1.

D'un point de vue physiologique la réduction dans l'activité de la PON1 au cours du vieillissement peut être un facteur non négligeable dans l'augmentation du risque d'incidence des maladies cardio-vasculaires chez les personnes âgées.

Mots clés: Paraoxonase1, athérosclérose, groupement thiol, oxydation des HDL, vieillissement.

À la mémoire de ma mère

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES	III
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	IV
RÉSUMÉ	
1. INTRODUCTION	1
1.1 ATHÉROSCLÉROSE	1
1.1.1 Définition et facteurs de risques	1
1.1.2 Structure des artères.....	3
1.2 STRESS OXYDATIF.....	5
1.2.1 Systèmes oxydants.....	5
1.2.2 Systèmes antioxydants.....	7
1.3 RÔLE DU STRESS OXYDATIF DANS L'ATHÉROSCLÉROSE	10
1.3.1 Chimie de l'oxydation des LDL	10
1.3.2 Oxydation des LDL et initiation des lésions athérosclérotiques.....	13
1.4 RÔLE ANTIATHÉROGÈNE DES LIPOPROTÉINES DE HAUTE DENSITÉ HDL.....	17
1.4.1 La paraoxanase (PON).....	18
1.4.1.1 Synthèse et propriétés de la PON1	18
1.4.1.2 Gène et structure de la PON1	21
1.4.1.3 Propriétés antioxydantes de la PON1	24
1.5 CONTEXTE ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES DE L'ÉTUDE.....	27
2. RÉSULTATS.....	29
2.1 ARTICLE 1 : PON1 paraoxonase activity is reduced during HDL oxidation and is an indicator of HDL antioxidant capacity	29
2.2 LIEN ENTRE LES DEUX ARTICLES	57

2.3	ARTICLE 2 : Age-related decrease in high-density lipoproteinS antioxidant activity is due to an alteration in the PON1's free sulphydryl groups.....	58
3.	DISCUSSION.....	97
3.1	EFFET DE L'OXYDATION DES HDL SUR L'ACTIVITÉ PARAOXONASE.....	97
3.2	EFFET DE L'ÂGE SUR LES PROPRIÉTÉS ANTIOXYDANTES DES HDL ET DE LA PON1.....	100
3.3	RÔLE DU GROUPEMENT THIOLS DE LA CYSTÉINE 284 DANS L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DE LA PON1.....	104
3.4	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	105
4.	REMERCIEMENTS.....	108
5.	RÉFÉRENCES	110

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

TABLEAU 1 :	Facteurs de risques de l'athérosclérose	2
FIGURE 1 :	Structure normale des artères de grand calibre	4
TABLEAU 2 :	Espèces réactives de l'oxygène et radicaux libres impliqués dans le stress oxydatif	7
FIGURE 2 :	Antioxydants et système de défense contre les radicaux libres	9
FIGURE 3 :	Schéma de la peroxydation lipidique d'un acide gras polyinsaturé	12
FIGURE 4 :	Oxydation des LDL dans l'espace sous endothélial et formation des cellules spumeuses.....	16
FIGURE 5 :	Rôle de la paraoxonase 1 associée aux HDL dans l'inhibition de l'oxydation des LDL dans l'espace sous endothélial	19
FIGURE 6 :	Structure et composition en acide aminés de la PON1	23
FIGURE 7 :	Mécanisme probable de l'hydrolyse des produits de la peroxydation lipidique dans les LDL par les enzymes PON1 et PAF-AH.....	26
FIGURE 8 :	Altération de la composition des HDL dans les conditions du stress oxydatif	102

LISTE DES ABRÉVIATIONS

HDL	Lipoprotéines de haute densité
LDL	LipoprotéineS de faible densité
PON	Paraoxonase
CML	Cellules musculaires lisses
$O_2^{\cdot -}$	Anion superoxyde
HO^{\cdot}	Radical hydroxyle
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ROO^{\cdot}	Radical peroxyde
RO^{\cdot}	Radical alkoxyde
ROOH	hydroperoxyde
4 -HNE	4 - Hdroxynonenal
MDA	Malondialdehyde
HPODE	Hydroperoxyoctadecadienoic acid
HPETE	Hydroxy peroxy eicosatetraenoic acid
PAPC	1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3- phosphocholine
POVPC	1-palmitoyl-2 (5-oxovaleroyl)-Sn-glycero 3phosphorylcholine
PGPC	1-palmitoyl-2-glutaroyl-Sn-glycero-3phosphorylcholine
CE	Cholestérol estérifié
PAF-AH	Acetyl - hydrolase du facteur d'activation des Plaquettes
Ops	Produits organophosphorés

1. INTRODUCTION

1.1 Athérosclérose

1.1.1 Définition et facteurs de risques

L'athérosclérose est une pathologie qui touche les artères de moyen et de grand calibre. L'athérosclérose est la principale cause des maladies cardio-vasculaires (MCV) responsables d'environ 50% des mortalités dans les sociétés industrialisées. Les études épidémiologiques ont montré que l'athérosclérose est associée à de nombreux facteurs de risques. Cependant, le progrès de la définition des interactions moléculaires et cellulaires impliquées dans le processus de la formation de la plaque d'athérosclérose a été entravé par la complexité étiologique de la maladie (KEANEY, 2000).

Au cours des dix dernières années, les nouveaux outils de la recherche, notamment les modèles de souris génétiquement modifiées, ont permis de comprendre plus clairement les mécanismes moléculaires qui sont associés avec le métabolisme du cholestérol et les autres facteurs de risques impliqués dans le développement de l'athérosclérose (CASTELLI et al., 1986).

Les facteurs de risques associés à l'athérosclérose peuvent être classés en facteurs de risques avec une composante génétique, et d'autres qui sont associés à l'environnement (Tableau 1). Il est maintenant bien établi que l'athérosclérose est non seulement une conséquence dégénérative et inévitable du vieillissement, mais aussi une condition chronique et inflammatoire qui peut évoluer en un événement clinique suite à une rupture de plaque et à une thrombose (LUSIS, 2000) (ROSS, 1999a).

FACTEURS DE RISQUES AYANT UNE COMPOSANTE GÉNÉTIQUE IMPORTANTE
Niveau élevé des LDL/VLDL
Niveau faible des HDL
Niveau élevé de la lipoprotéine (a)
Hypertension
Niveau élevé de l'homocystéine
Hypercholestérolémie familiale
Diabète et obésité
Sexe et âge
Niveau élevé des molécules inflammatoires comme la CRP
Syndrome métabolique
FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX
Diète riche en gras
Tabagisme
Niveau faible en antioxydants
Sédentarité

Tableau 1: Facteurs de risques de l'athérosclérose d'après KEANEY, 2000; LUSIS, 2000.

1.1.2 STRUCTURE DES ARTÈRES

L'athérosclérose est une maladie progressive caractérisée par l'accumulation des lipides et des éléments fibreux au niveau de l'espace sous endothéliale des artères.

La structure normale des artères est montrée dans la figure 1. la paroi des artères est composée de trois tuniques :

L'intima : C'est la tunique la plus interne de l'artère, elle est limitée par une monocouche continue de cellules endothéliales.

L'espace sous endothélial comprend une couche interne (sous-jacente à l'endothélium) formée d'un tissu conjonctif non fibreux riche en proteoglycans. Cette couche présente parfois des macrophages et des cellules musculaires lisses (CML) principalement sous forme de cellules isolées.

La deuxième couche (adjacente à la média) contient plus de CML, de fibres élastiques et de collagène par rapport à la couche supérieure.

La média : La média s'allonge en dessous de la lamina élastique interne et consiste essentiellement en CML produisant du collagène, et aussi en CML contractiles orientées diagonalement, ces dernières sont impliquées dans la vasodilatation et la vasoconstriction de l'artère.

L'adventice : La couche la plus externe contient des fibroblastes, des CML et du tissu conjonctif peu organisé. Elle est irriguée par des vasa vasorum et elle est parcourue par des terminaisons nerveuses

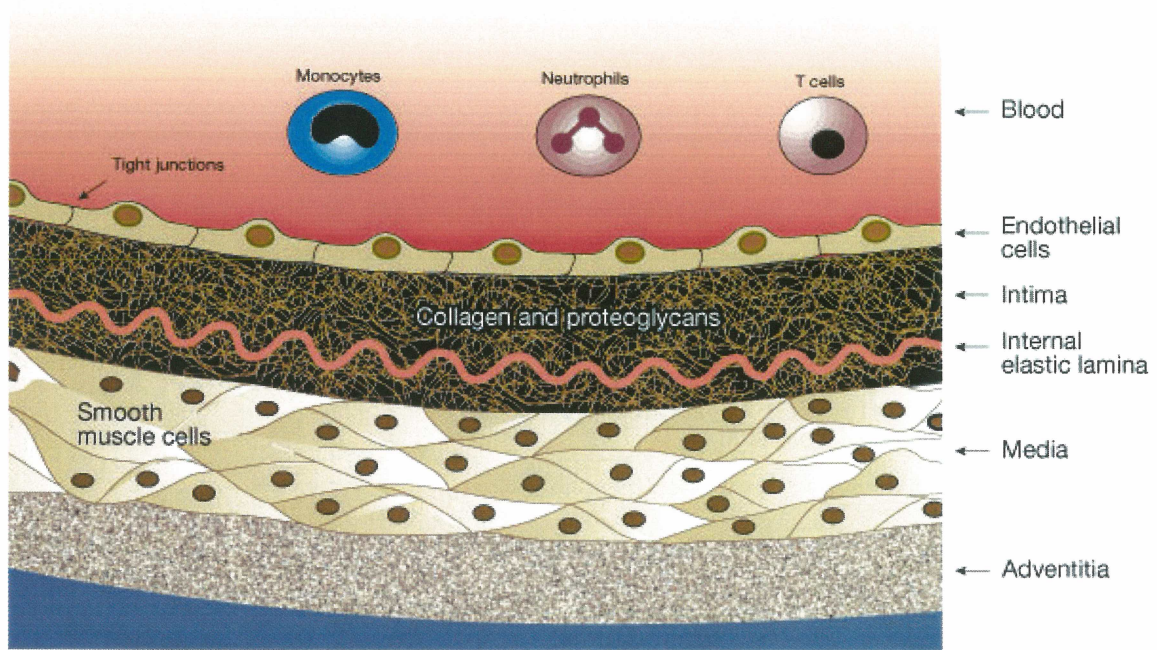


FIGURE 1: Structure normale des artères de grand calibre. Tirée de (LUSIS, 2000).

1.2. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme étant un déséquilibre entre la production des oxydants (radicaux libres) et les systèmes de défense antioxydants. Il est considéré comme la base moléculaire de la dégradation oxydative de nombreux composés cellulaires fondamentaux. En effet, dans les conditions du stress oxydatif, différentes cibles moléculaires peuvent être oxydées et leurs propriétés biologiques fortement altérées : les acides nucléiques (anomalie de synthèse des protéines, mutagénèse etc), les polysaccharides et les protéines (altération de la structure de certains tissus), les lipides (altération de la structure et des fonctions des membranes et des lipoprotéines). Les réactions radicalaires du stress oxydatif sont impliquées dans de nombreux processus biologiques qui entraînent la mort cellulaire et l'accélération du vieillissement ainsi que la promotion de certaines maladies tels que le cancer (FINKEL et HOLBROOK, 2000).

Le stress oxydatif peut résulter :

- (1) D'une diminution dans l'activité de certains enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase ou la glutathion peroxydase ou encore suite à une réduction dans les teneurs plasmatiques en antioxydants apportés par l'alimentation (BENZIE, 1996).
- (2) D'une augmentation de la production des radicaux libres due soit à une exposition élevé aux toxines environnementales ou bien à une activation inapproprié des cellules phagocytaires dans le cas des maladies inflammatoires chroniques (ROSS, 1999b).

1.2.1 Systèmes oxydants

L'oxygène est un élément essentiel à la vie des organismes aérobiques, mais il représente aussi une substance potentiellement nuisible. En effet, la formation des métabolites actifs

de l'oxygène, connus sous le nom des espèces réactives de l'oxygène (ERO), se fait normalement au cours du métabolisme intracellulaire dans les mitochondries, les peroxisomes et à partir de plusieurs systèmes enzymatiques. De plus, nombreux agents externes peuvent déclencher la production des ERO comme les toxines environnementales (FINKEL et HOLBROOK, 2000).

Le terme « espèces réactives de l'oxygène » est un terme général utilisé pour désigner non seulement les radicaux libres oxygénés ($O_2^{\cdot -}$ et HO^{\cdot}) mais aussi les dérivés non radicalaires de l'oxygène tels que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Tableau 2). Un radical libre est par définition, toute espèce chimique contenant un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche périphérique externe. La présence de cet électron célibataire rend les radicaux libres extrêmement instables et très réactifs. Ainsi pour compléter sa couche périphérique, un radical libre peut soit capter soit céder un électron à une molécule avoisinante, il peut alors se comporter comme un oxydant ou comme un réducteur. Comme résultat de cette réactivité la plupart des radicaux libres ont une demi-vie très courte dans les systèmes biologiques (10^{-6} secondes ou moins) (FANG et al, 2002).

RADICAUX LIBRES	
$O_2^{\cdot -}$: anion superoxyde	Formé dans de nombreuses réactions d'auto-oxydation (flavoprotéines, cycles redox...)
HO_2^{\cdot} : radical perhydroxyle	Forme protonée de $O_2^{\cdot -}$, plus liposoluble
OH^{\cdot} : radical hydroxyle	Formé par la réaction de Fenton, très réactif (demi-vie de 10^{-9} s)
RO^{\cdot} : radical alkoxyle	Radical centré sur l'oxygène (lipides)
ROO^{\cdot} : radical peroxyde	Formé à partir des hydroperoxyde (lipides)
ESPÈCES NON - RADICALAIRES	
H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène	Formé par dismutation de $O_2^{\cdot -}$, peut diffuser dans la cellule
$ROOH$: hydroperoxyde	Lipides
$HOCl$: acide hypochlorique	Agent oxydant produit par la myeloperoxydase dans les neutrophiles activés
$ONOO^-$: peroxynitrite Appartient aussi aux espèces réactives du nitrogène (ERN)	Produit par réaction de l'oxydes nitrique NO^{\cdot} avec le $O_2^{\cdot -}$ ou les métaux de transition
1O_2 : oxygène singulet	État excité, 23Kcal/mole au-dessus de l'état fondamental, 10^{-6} s

TABLEAU 2 : Espèces réactives de l'oxygène et radicaux libres impliqués dans le stress oxydatif. D'après (HALLIWEL et GUTTERIDGE, 1989).

1.2.2 Systèmes antioxydants

Vivre dans un environnement oxygéné a exigé, au cours de l'évolution, des stratégies cellulaires efficaces pour détecter et détoxifier les métabolites de l'oxygène moléculaire.

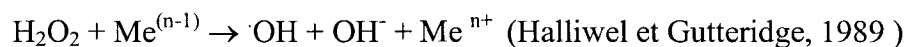
Les cellules ont donc développé des systèmes enzymatiques et non enzymatiques de défense connus sous le nom d'antioxydants (YOUNG et WOODSIDE, 2001). Les systèmes antioxydants s'opposent et régulent le niveau global des ERO afin de maintenir l'homéostasie physiologique (FANG et al., 2002) (Figure 2).

Dans le groupe des enzymes antioxydantes on trouve la superoxyde dismutase qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le

peroxyde d'hydrogène est pris en charge par la catalase et la glutathion peroxydase qui le convertissent en eau (H₂O) et en oxygène (O₂). Ces différentes enzymes constituent le système antioxydant primaire.

Le système antioxydant secondaire est composé des vitamines qui peuvent être hydrosolubles ou liposolubles. Ces antioxydants correspondent à des molécules capables d'accepter ou de céder un électron à un radical libre pour former des produits stables. Les antioxydants secondaires sont capables d'inhiber la phase d'initiation de l'oxydation en captant les radicaux libres, mais également en bloquant la propagation de l'oxydation. Dans ce cas, on parle d'antioxydants briseurs de chaîne (exemple la vitamine E) (YOUNG et WOODSIDE, 2001)

Une autre classe d'antioxydants (les antioxydants tertiaires) comprend les protéines qui chélatent les métaux de transition. En effet, les ions métalliques (cuivre et fer) peuvent contribuer à la formation du radical hydroxyl via la réaction de Fenton:



Les protéines comme la ceruloplasmine, la transferrine ou la ferritine sont capables de se lier aux ions métalliques pour empêcher la formation du radical hydroxyle qui est un radical hautement réactif.

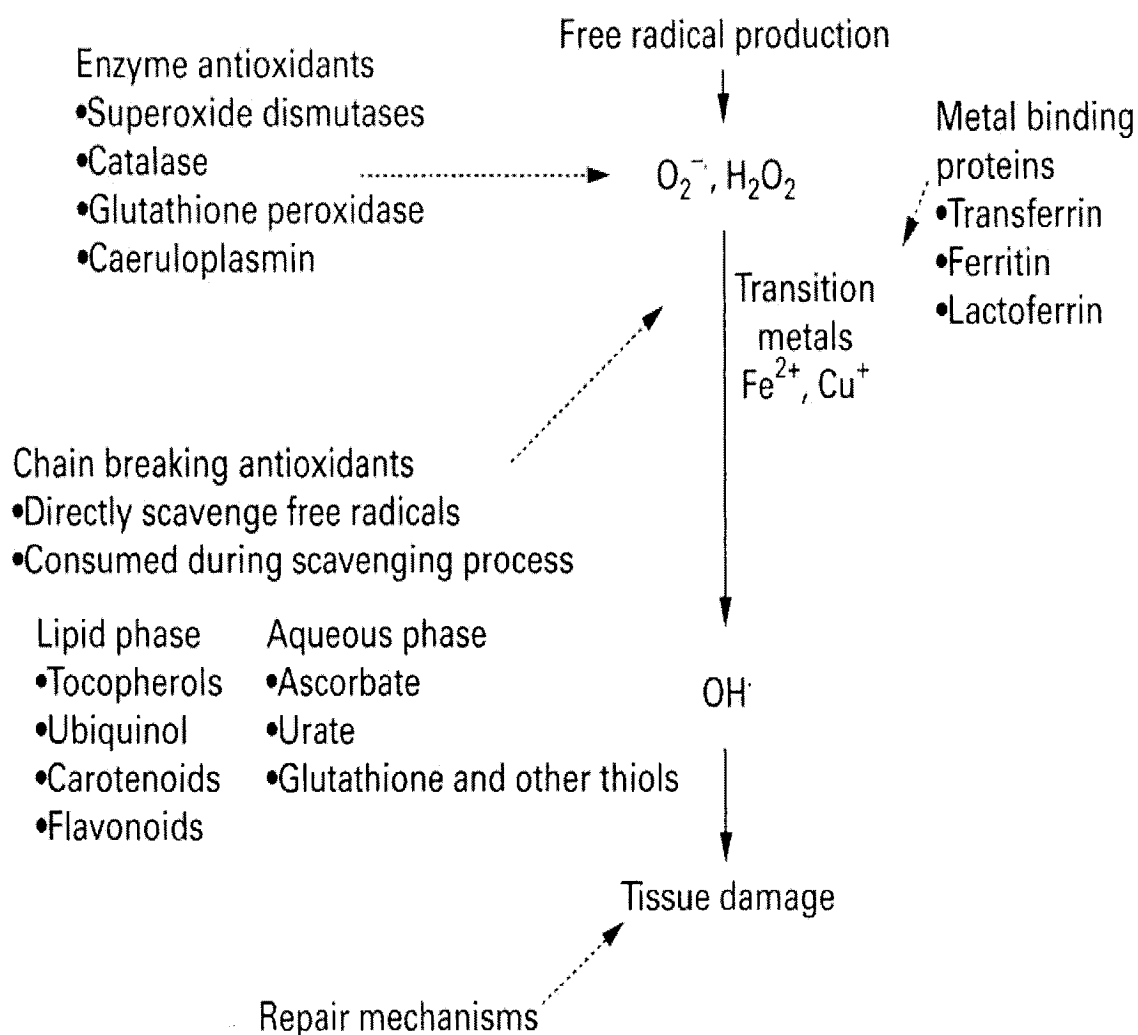


FIGURE 2: Antioxydants et système de défense contre les radicaux libres d'après (YOUNG ET WOODSIDE, 2001).

1.3. Rôle du stress oxydatif dans l'athérosclérose

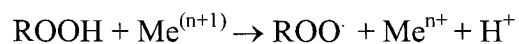
1.3.1 Chimie de l'oxydation des LDL

Selon la théorie oxydative de l'athérosclérose (STEINBERG, 1997), l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) dans la paroi artérielle joue un rôle important dans le développement de l'athérosclérose (ESTERBAUER et al, 1992). Ces modifications oxydatives impliquent les espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites lors d'un stress oxydatif. L'oxydation des LDL est arbitrairement divisée en trois étapes : initiation, propagation et décomposition.

La première étape (initiation) se traduit par l'abstraction de l'hydrogène en position bisallylique à partir d'un acide gras polyinsaturés. Il est important de mentionner que l'entité précise de l'initiation de la peroxydation lipidique dans les systèmes biologiques n'est pas encore bien établie. Le radical hydroxyl, ayant une demi-vie très courte (10^{-9} s), présente une réactivité suffisante pour déclencher cette première réaction radicalaire. Le radical formé au cours de cette étape tend à être stabilisé par un réarrangement moléculaire conduisant à la formation d'un diène conjugué. En présence de l'oxygène, ce dernier se transforme en radical peroxy ROO^\cdot .

Lors de l'étape de propagation, les radicaux peroxydes arrachent à leur tour un atome d'hydrogène à une autre molécule d'acide gras avoisinante, induisant ainsi la propagation de la chaîne de peroxydation lipidique ce qui engendre la formation d'un hydroperoxyde ROOH et un autre radical libre (Figure 3)

La formation des hydroperoxydes rend les LDL plus susceptibles à l'oxydation en particulier en présence des ions métalliques et implique leur décomposition en radicaux peroxyde (ROO^\cdot) et alkoxyde (RO^\cdot) selon les réactions suivantes :



Au cours de l'étape de décomposition, les hydroperoxydes formés, peuvent subir des réactions de beta-scission pour former des composés aldéhydiques tels que le 4-hydroxynonenal (HNE), le malondialdéhyde (MDA) et le 2,4 heptadienal (KEANEY, 2000). Ces composés ont tendance à interagir avec les groupements lysine chargés positivement dans l'apo-B. L'augmentation de la charge négative des LDL augmente aussi leur affinité aux récepteurs « scavenger » présents au niveau des macrophages.

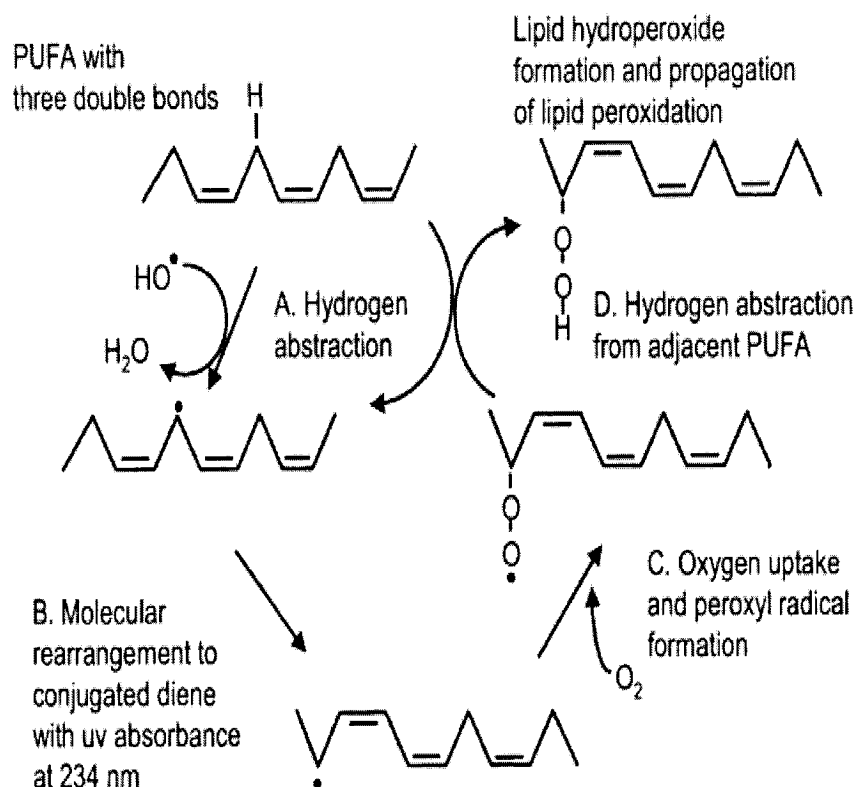


FIGURE 3: Schéma de la peroxydation lipidique d'un acide gras polyinsaturé tiré de (KEANEY, 2000). L'abréviation PUFA désigne un acide gras polyinsaturé.

1.3.2 Oxydation des LDL et initiation des lésions athérosclérotiques

Les lésions athérosclérotiques précoces consistent en une accumulation sous endothéliale du cholestérol dans les macrophages, qui se transforment en cellules spumeuses « foam cells ». Chez l'homme, de telles lésions lipidiques peuvent être observées dans l'aorte à partir des dix premières années de la vie.

L'accumulation des LDL dans l'espace sous endothéliale est considérée comme l'événement initiateur de l'athérosclérose, elle augmente lorsque le niveau des LDL circulantes est élevé, ainsi le transport et la rétention des LDL dans les sites de la formation des lésions deviennent de plus en plus importants.

Les LDL diffusent passivement via la jonction des cellules endothéliales, leur rétention dans la paroi artérielle semble impliquer des interactions entre l'apolipoprotéine B (apo B) et les proteoglycans (BOREN et al., 1998). D'autres lipoprotéines contenant l'apo-B, principalement les particules résiduelles des chylomicrons et la lipoprotéine (a) (une particule qui ressemble aux LDL mais contenant des polypeptides additionnels appelés apolipoprotéine (a) reliés avec l'apolipoprotéine (B) par un pont disulfure), sont particulièrement athérogènes et ont des effets de fibrinolyse et de croissance sur les cellules musculaires lisses (GRAINGER et al, 1994), ils peuvent ainsi s'accumuler dans l'intima et initier l'athérosclérose.

Plusieurs études ont montré que les LDL natives (non oxydées) ne sont pas reconnues par les macrophages et donc incapables d'induire la formation de cellules spumeuses (STEINBERG et al, 1989). C'est au début des années 80 qu'il a été proposé que les LDL peuvent être modifiées dans la paroi artérielle. En effet, les LDL piégées dans l'espace

sous endothélial peuvent subir des modifications, comme l'oxydation, la lipolyse, la protéolyse et l'agrégation. Ces modifications contribuent à l'inflammation ainsi qu'à la formation des cellules spumeuses.

L'oxydation des LDL représente la modification la plus importante dans la formation des lésions précoces. L'une des voies probables de l'initiation de la peroxydation lipidique dans les LDL sont les produits de la voie de la 12 lipoxigénase notamment l'hydroperoxyoctadécadiénoïque acid (HPODE) et l'hydroxy peroxy eicosatétraénoïque acid (HPETE). Une fois la concentration critique de ces produits est atteinte, l'oxydation non enzymatique des phospholipides contenant l'acide arachidonique en position Sn-2 dont le 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-Sn-glycéro-3-phosphocholine (PAPC) conduit à la formation des LDL modérément oxydées (MM-LDL) contenant les phospholipides pro-inflammatoires notamment le 1-palmitoyl-2 (5-oxovaléroyl)-Sn-glycéro-3-phosphorylcholine (POVPC) et le 1-palmitoyl-2-glutaroyl-Sn-glycéro-3-phosphorylcholine (PGPC) (NAVAB et al., 2001)

La seconde étape de l'oxydation des LDL *in vivo* commence lorsque les monocytes recrutés au niveau des lésions se convertissent en macrophages. Comme nous l'avons déjà signalé, les modifications oxydatives des LDL impliquent les espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites par les cellules endothéliales, les macrophages et aussi par plusieurs enzymes telles que la NADPH-oxydase, la lipoxygénase, la myéloperoxydase et la sphingomyélinase (PARTHASARATHY et al, 1989). Ces espèces réactives altèrent non seulement les lipides lors de la peroxydation lipidique mais aussi la portion protéique (apoB100) dans les LDL et transforment ainsi les MMLDL en LDL dites hautement

oxydées (ox-LDL). L'accumulation des ox-LDL dans les macrophages conduit à la formation des cellules spumeuses; étape clé dans le processus d'athérosclérose (Figure 4). La phagocytose des LDL hautement oxydées par les macrophages se fait via un groupe de récepteurs, notamment les récepteurs scavenger A (SR-A) et CD 36 qui reconnaissent un large spectre de ligands. Enfin l'apoptose des macrophages entraîne le dépôt d'une masse extracellulaire de lipides et d'autres débris cellulaires. Les lésions fibreuses sont caractérisées par une croissance de cette masse lipidique, principalement formée de cholestérol et de ces esters et par l'accumulation des cellules musculaires lisses ce qui entraîne la réduction de la lumière artérielle.

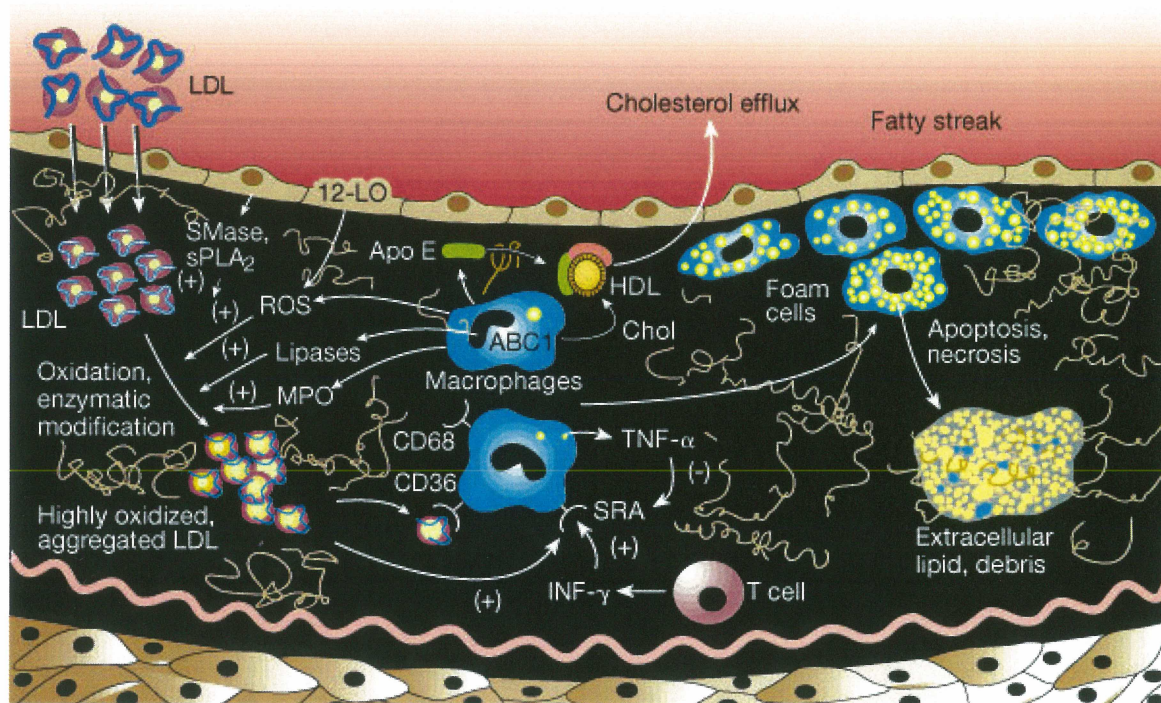


FIGURE 4: Oxydation des LDL dans l'espace sous endothéliale et formation des cellules spumeuses. Tirée de (LUSIS, 2000).

1.4 Rôle antiathérogène des lipoprotéines de haute densité HDL

Les études épidémiologiques ont montré que contrairement aux LDL, le niveau des HDL est inversement corrélé avec le risque d'incidence des MCV (STAMPFER et al, 1991).

Il est maintenant bien établi que les HDL sont capables de protéger les LDL des modifications oxydatives (Mackness & Durrington, 1995). Plusieurs mécanismes par lesquels les HDL peuvent inhiber la formation et ou les propriétés athérogènes des ox-LDL ont été proposés. En effet, les ox-LDL peuvent échanger leurs produits oxydés avec les HDL (PARTHASARATHY et al, 1990) qui les convertissent en produits stables (SATTler et al, 1995). De plus, l'apo AI, la transferrine et la ceruloplasmine associées aux HDL peuvent chélater les métaux de transition et empêcher ainsi l'oxydation des lipoprotéines dans l'espace sous endothélial.

La relation inverse entre le niveau des HDL plasmatiques et le risque du développement de l'athérosclérose est associée d'une part à leur rôle dans le transport inverse du cholestérol mais aussi à leurs activités antioxydantes et anti-inflammatoires. Ces deux dernières activités sont dues principalement aux enzymes qui leur sont associées notamment la paraoxonase 1 et 3 (PON1 et PON3), l'acétyl hydrolase du facteur d'activation des plaquettes (PAF-AH). Ces enzymes ont en effet montré une capacité à protéger les LDL de l'oxydation in vitro, à travers la neutralisation des phospholipides oxydés dans les LDL (WATSON et al., 1995).

1.4.1. La paraoxonase (PON)

1.4.1.1. Synthèse et propriétés de la PON1

La paraoxonase est une famille de trois membres, la PON1, la PON2 et la PON3. L'enzyme paraoxonase1 (PON1) EC 3.1.8.1 est synthétisée par le foie et elle est exclusivement associée aux HDL. Elle prévient l'oxydation des LDL et neutralise les phospholipides oxydés s'opposant ainsi au développement de la plaque d'athérome (Figure 5). La paraoxonase1 tient son nom du substrat organophosphoré utilisé initialement pour la caractériser, le paraoxon (E600, diethyl *p*-nitrophenyl phosphate). En effet les produits organophosphoré (Ops), pesticides (tels que le paraoxon) et aussi des agents chimiques (sarin, soman et VX) sont parmi les composés les plus toxiques. La toxicité de ces produits est liée à l'inhibition de l'acétylcholinestérase au niveau des jonctions cholinergiques périphériques et centrales.

C'est en 1946 que le chercheur Mazur a décrit pour la première fois, l'activité hydrolase des Ops dans le plasma humain et dans plusieurs tissus de différentes espèces animales à l'exception des poissons, des oiseaux et des insectes. (MAZUR, 1946)

L'activité paraoxonase est présente dans le plasma humain à la naissance et chez les nouveaux nés prématurés (MUELLER et al., 1983). A partir de l'âge adulte, l'activité de la PON1 diminue significativement au cours du vieillissement (MILOCHEVITCH et KHALIL, 2001; SERES et al, 2004)

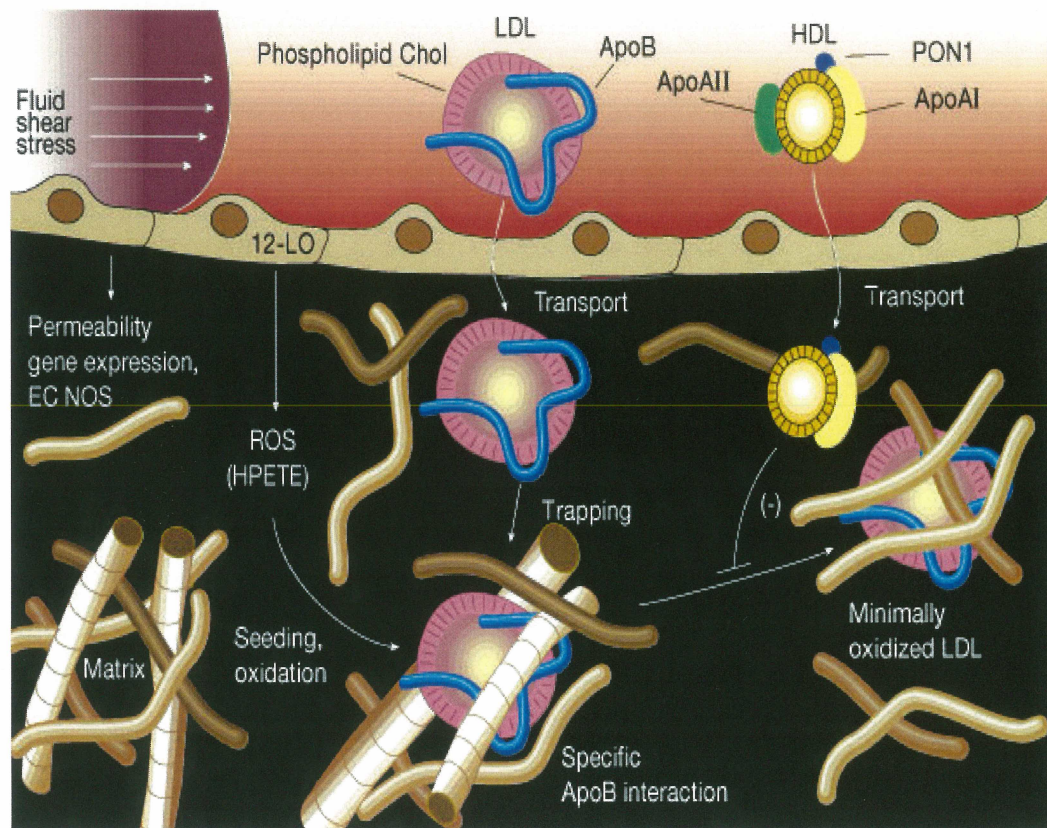


FIGURE 5: Rôle de la paraoxonase 1 associée aux HDL dans l'inhibition de l'oxydation des LDL dans l'espace sous endothéliale d'après (LUSIS, 2000)

Chez l'humain la PON1 est essentiellement exprimée par les hépatocytes, mais elle est aussi faiblement présente au niveau du cerveau, des poumons des reins et du cœur (PRIMO-PARMO et al, 1996). Durant la progression de l'athérosclérose, la PON1 s'accumule dans la paroi artérielle essentiellement au niveau des cellules endothéliales et musculaires lisses (SORENSEN et al., 1999). Cependant il n'est pas encore établi avec certitude si les cellules de ces tissus sont capables de synthétiser la PON1 ou bien si elle leur est transférée à partir des HDL (MACKNESS et al, 1997).

Dans le plasma, la PON 1 est liée principalement à une fraction (environ 1%) des HDL (NAVAB et al., 1997). L'origine de la spécificité de l'association PON1-HDL n'est pas connue, plusieurs auteurs ont rapporté que la PON1 est associée avec la sous population des α_2 HDL contenant l'apo j et l'apo AI (KELSO et al., 1994) et que le domaine N terminal hydrophobe facilite l'interaction entre l'enzyme et la particule HDL.

La PON1 humaine a été purifiée pour la première fois par Gan et al. en 1991 (GAN et al., 1991). Elle a un poids moléculaire d'environ 44 kDa, et elle renferme deux ions Ca^{2+} dont un participe directement à la catalyse enzymatique, tandis que l'autre ion de calcium assure la stabilité structurale (KUO et LA DU, 1998). La structure tridimensionnelle de la PON1 a été récemment établie (HAREL et al., 2004), elle montre un site actif enfoncé dans un environnement très hydrophobe c'est ce qui explique la capacité de l'enzyme à hydrolyser de nombreux substrats chimiques et organiques hydrophobes (lipides et esters).

1.4.1.2. Gène et structure de la PON1

Le génome humain contient au moins trois gènes PON, identifiés PON1, PON2 et PON3 selon l'ordre de leur découverte (PRIMO-PARMO et al., 1996). La grande similarité de la séquence en acides aminés des enzymes paraoxonases suggère qu'elles partagent les mêmes activités enzymatiques et/ou le même rôle physiologique.

Au début des années 50, Aldridge a décrit les caractéristiques générales des paraoxonases (PONs) dans différentes espèces de mammifères et il proposa la définition des «esterases de type A» pour les enzymes qui hydrolysent les Ops et l'acétate de phényle (l'arylestere) (ALDRIDGE, 1953b). Cependant les «esterases de type B» comme les carboxylesterases sont complètement inhibés par l'arylestere (ALDRIDGE, 1953a). La PON1 est une estérase de type A, elle possède un large spectre de substrats chimiques. Tous comme la PON2 et la PON3, la PON1 est une lactonohydrolase (DRAGANOV et al., 2000).

La PON1 consiste en une séquence de 355 acides aminés hautement glycosylée (Figure 7) (DRAGANOV et al., 2000; FURLONG et al., 1993). L'enzyme possède trois résidus cystéine, dont deux sont reliés par un pont disulfure. Le groupement thiol (SH) libre de la cystéine en position 284 est un centre nucléophile dans le site actif qui serait impliqué dans l'activité antioxydante de la PON1 (DRAGANOV et al., 2000; SORENSON et al., 1995; FURLONG et al., 1993).

On connaît quatre allélozymes de la PON1 humaine qui diffèrent par la nature des aminoacides en position 55 méthionine (M) ou leucine (L) et 192 glutamine (Q) ou asparagine (R). Ces polymorphismes sont distingués par leurs activités enzymatiques vis-à-vis certains substrats (SMOLEN et al., 1991). Ainsi des substrats dits polymorphes ou

discriminatoires, tels que le paraoxon, le diazoxon et le sarin sont hydrolysés avec des vitesses différentes par les allélozymes Q et R. Le chlorpyrifos-oxon et l'acétate de phényle sont hydrolysés à la même vitesse par les quatre allélozymes. In vitro, on utilise principalement le paraoxon (activité paraoxonase) et l'acétate de phényle (activité arylestérase) pour identifier les phénotypes de la PON1.

La modulation de l'activité enzymatique de la paraoxonase a été attribuée à deux polymorphismes génétiques. Le premier caractérise l'isozyme avec l'arginine en position 192 (R ou phénotype B) qui présente une forte activité paraoxonase, ou bien l'isozyme avec la glutamine en position 192 (Q ou phénotype A) qui possède au contraire une faible activité paraoxonase (Adkins et al, 1993).

Le second polymorphisme M/L au niveau de l'acide aminé 55, module la concentration plasmatique de l'enzyme (GARIN et al., 1997). Les porteurs de l'allèle L 55 possèdent une concentration plasmatique de la PON1 plus élevée que les porteurs de l'allèle M55.

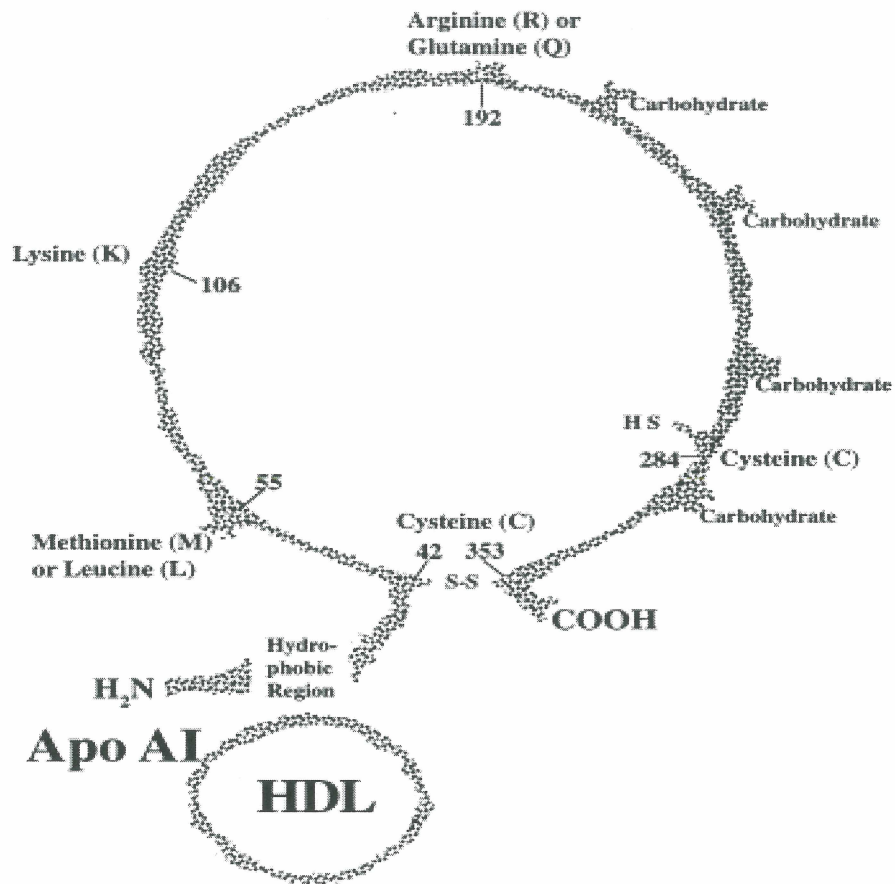


Figure 6: Structure et composition en acide aminés de la PON1 tirée de (LA DU et al., 1999)

1.4.1.3. Propriétés antioxydantes de la PON1

La PON1 prévient l'oxydation des LDL par son activité peroxydasique vis-à-vis des ERO telles que le H_2O_2 (AVIRAM et al., 1998). Ainsi, elle bloque la propagation de la peroxydation lipidique. D'autre part, la PON1 neutralise les phospholipides oxydés notamment le POGPC, les esters hydroperoxydés du cholestérol et de l'acide linoléique (AVIRAM et FUHRMAN, 1998). En effet, l'oxydation des phospholipides dans le plasma produit de nombreux dérivées de phosphatidylcholine notamment les hydroperoxydes, les isoprostanes et des dérivés aldéhydiques (AHMED et al., 2002) qui seront inactivés par hydrolyse enzymatique. La PON1 métabolise les dérivés le l'acide arachidonique oxydé en position Sn-2 des phospholipides. On suppose que la paraoxonase hydrolyse les produits de l'oxydation des phospholipides à longue chaîne (WATSON et al., 1995) et le cholestérol estérifié (CE). Le mécanisme de neutralisation des phospholides oxydés par la PON1 implique le résidue cystéine libre en position 284 (AVIRAM, 1999; AVIRAM et al., 2000). La PON1 intervient en tandem avec la PAF-AH; qui est considérée comme une «deuxième ligne de défense» hydrolysant les peroxydes lipidiques à courte chaîne (Figure 7).

De nombreuses études épidémiologiques visant à établir une relation entre l'activité paraoxonase et la prévalence des MCV montrent que l'activité PON1 est abaissée dans le cas de plusieurs pathologies qui représentent un facteur de risque pour l'athérosclérose tels que le diabète et l'hypercholestérolémie familiale (MACKNESS et al, 2002). L'activité paraoxonase diminue aussi chez les fumeurs et au cours du vieillissement (MILOCHEVITCH et KHALIL, 2001; SERES et al., 2004).

La preuve du rôle antioxydant de la paraoxonase a été démontré dans les modèles de souris transgéniques. En effet, les souris dont le gène codant pour la PON1 n'est pas exprimé (knock –out; KO) ont tendance à développer des lésions athéromateuses plus importantes que les souris normales (SHIH et al., 1998). D'autre part, les HDL des oiseaux (dépourvus naturellement de PON1) et celles des souris PON1-KO ne présentent aucune activité antioxydante in vitro (MACKNESS et al, 1998).

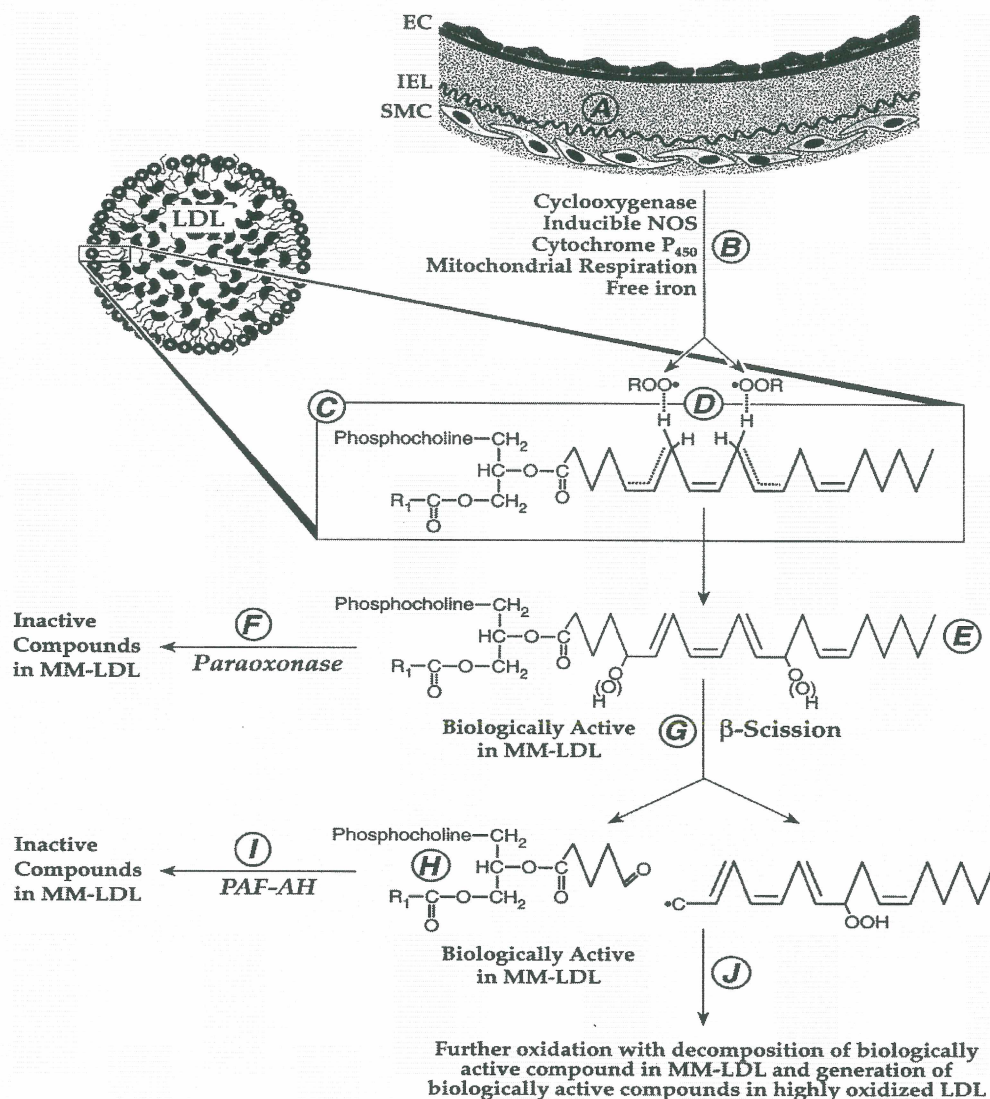


FIGURE 7: Mécanisme probable de l'hydrolyse des produits de la peroxydation lipidique dans les LDL par les enzymes PON1 ET PAF-AH tirée (WATSON et al., 1995). Les abréviations EC, IEL et SMC désignent respectivement les cellules endothéliales, la limitante élastique interne et les cellules musculaires lisses.

1.5 Contexte et objectifs spécifiques de l'étude

Le développement des lésions athérosclérotiques au niveau des artères du cœur, du cerveau et des membres inférieurs est un problème qui touche particulièrement les personnes âgées et qui est responsable de la majorité des cas de mortalité et de morbidité dans cette classe d'âge.

La preuve que l'oxydation des LDL joue un rôle important dans le développement de l'athérosclérose bénéficie aujourd'hui de forts arguments (YOUNG et PARTHASARATHY, 1994). Cependant, peu d'études se sont intéressées à l'oxydation des HDL et à leurs effets dans le processus de l'athérosclérose. Nous proposons donc d'étudier l'effet de l'oxydation sur l'activité antioxydante des HDL, avec une attention particulière sur l'activité enzymatique de la PON1.

Comme nous l'avons signalé, l'effet protecteur des HDL contre l'athérosclérose est principalement dû à l'action de l'enzyme PON1. Une étude menée dans notre laboratoire démontre que l'activité paraoxonase de la PON1 diminue au cours du vieillissement (MILOCHEVITCH et KHALIL, 2001). Ainsi l'objectif de ce projet est d'étudier les altérations des propriétés anti-athérogènes des HDL et de la PON1 au cours du vieillissement. Pour ce faire, nous voulions atteindre les objectifs spécifiques suivants :

- 1- Étudier les effets de l'oxydation des HDL sur les propriétés antioxydantes de la PON1
- 2- Comparer le potentiel des HDL à protéger les LDL contre l'oxydation chez des sujets âgés et jeunes
- 3- Déterminer le potentiel antioxydant de la PON1 chez les sujets âgés en comparaison avec des sujets jeunes

- 4- Déterminer les mécanismes responsables de l'altération de l'activité antioxydante de la PON1 avec l'âge en particulier le site actif impliqué dans l'hydrolyse des lipides oxydés.

2. RÉSULTATS

2.1 Article 1: PON1 paraoxonase activity is reduced during HDL oxidation and is an indicator of HDL antioxidant capacity.

Article publié dans la revue Free Radical Research en janvier 2003.
Inclus dans le mémoire avec la permission des auteurs en juillet 2005.

Abdelouahed Khalil, Christelle Milochévitch, Leila Jaouad

Résumé de l'article

L'objectif de cette étude est de déterminer les effets des modifications oxydatives des HDL sur leur potentiel antioxydant et sur l'activité de l'enzyme PON1.

Nous avons proposé d'étudier la peroxydation des HDL induite par différents systèmes oxydants : 1) oxydation induite par les cellules THP1, 2) oxydation induite par les ions Cu^{2+} et 3) oxydation induite par les radicaux libres oxygénés $\cdot\text{OH}$ et $\text{O}_2\cdot^-$ produits par la radiolyse gamma de l'eau.

L'oxydation des HDL est suivie par la mesure de la formation des diènes conjugués et des hydroperoxydes. L'activité paraoxonase de la PON1 est évaluée par la mesure de sa vitesse à hydrolyser le paraoxon. L'effet antioxydant des HDL est déterminé par la mesure de la protection des LDL contre l'oxydation.

Les résultats obtenus montrent que l'oxydation des HDL induit une altération de l'activité enzymatique de la PON1. Le degré d'inactivation de la PON1 augmente avec l'oxydation des HDL. De plus, l'altération de l'activité paraoxonase est accompagnée d'une réduction de l'activité antioxydante des HDL ($r=0.93$ $p<0.0054$).

**PON1 paraoxonase activity is reduced during HDL oxidation and is an indicator of
HDL antioxidant capacity**

Leila JAOUAD^{1,2}, Christelle MILOCHEVITCH¹, Abdelouahed KHALIL^{1,2,3*}

¹Centre de Recherche sur le Vieillissement – IUGS, ²Service de gériatrie, ³Département de Physiologie et Biophysique, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke.

*Author to whom correspondence should be addressed at: Centre de Recherche sur le Vieillissement – IUGS, 1036 belvédère sud, Sherbrooke (Qc) J1H 4C4, Sherbrooke, Canada. Fax: 1(819) 829 7141, email : akhalil@courrier.usherb.ca

ABSTRACT:

The aim of this study was to investigate the effect of HDL oxidation on PON1 paraoxonase activity. Also we were interested in investigating the mechanism by which PON1 could be inactivated and the correlation between its enzymatic activity and the antioxidant properties of HDL. Three different oxidation systems were used for the HDL oxidation: 1) oxidation induced by THP1 cells, 2) oxidation induced by copper ions at a concentration 10 μ M, and 3) oxidation induced by \cdot OH and $O_2^{\cdot-}$ oxygen free radicals produced by γ -radiolysis. HDL oxidation was followed by the measurement of lipid peroxide formation and HDL electrophoretic mobility, and PON1 activity was determined by measuring the rate of paraoxon hydrolysis. Our results show that HDL oxidation is accompanied by a reduction in the PON1 paraoxonase activity. The extent of PON1 inactivation depends both on the extent of HDL oxidation and on the oxidation system used. The rates of HDL oxidation and PON1 inactivation were significantly correlated ($r = 0.93$ $p < 0.0054$). Our results show that oxidized HDL loses its protective effect toward LDL oxidation. The antioxidant action of HDL towards LDL oxidation and the degradation of PON1 paraoxonase activity were significantly correlated ($r = 0.95$, $p < 0.04$).

Keywords: HDL, lipid peroxidation, PON1, paraoxonase activity, free radicals

INTRODUCTION:

The antioxidant effect of HDL is related, in part, to the PON1 enzyme [1,2]. However, the exact mechanism by which PON1 exerts its protective effect is not well established and it has been proposed that this antioxidant effect could be associated with the peroxidase-like activity of PON1 [2]. Thus, by hydrolyzing preformed lipid peroxides, PON1 can delay or inhibit the initiation of oxidation induced by metal ions. It is noteworthy that preformed lipid peroxides are essential for the initiation of LDL or HDL peroxidation induced by copper ions [3]. The PON1 activity has been demonstrated to be reduced in different pathologies associated with atherosclerosis such as diabetes, familial hypercholesterolemia, chronic renal failure, post-myocardial infarction and also with smoking and aging [4-7]. However, the real mechanism for PON1 inactivation remains a subject of debate. Even though PON1 activity was demonstrated to be reduced in these physio-pathological conditions, less interest was given to investigating the relationship between its enzymatic and antioxidant activities.

This study aimed to examine the effect of HDL oxidation on PON1 paraoxonase activity. We were also interested in the effect of the oxidant system on the kinetics of PON1 inactivation and the correlation between its enzymatic activity and antioxidant property of HDL.

METHODS

Subjects. Ten subjects (6 F and 4 M), aged between 25 and 39 years, participated to this study. They were all healthy volunteers and normolipidemic. Blood pressure profile, glycemia, fibrinogen level, lipid and coagulation profiles were within normal ranges. The

study was approved by the Ethics Committee of the Institut Universitaire de Gériatrie de Sherbrooke, and all subjects gave written informed consent.

LDL isolation. To avoid PON1 inactivation by EDTA, blood was collected in heparin from each donor. All precautions were taken to prevent lipoprotein modifications during the procedure. LDL ($1.019 < d < 1.063$) and HDL ($1.063 < d < 1.19$) were isolated by 2 hours of ultracentrifugation according to the method of Sattler *et al.* [9]. Proteins were measured by commercial assay (Pierce method, Rockford, IL, USA).

Cell-induced HDL oxidation. Monocytic THP1 cells were obtained from American Type Culture Collection (TIB-202) and cultured in RPMI 1640 medium containing 20 $\mu\text{mol/L}$ 2-mercaptoethanol, 10 % fetal serum and 40 $\mu\text{g/mL}$ gentamycin. For HDL oxidation, cells were washed three times with Ham's F-10 medium to remove serum and were plated at 3×10^6 cells/35 x 10-mm dishes in 1 mL Ham's F-10 medium supplemented with gentamycin (40 $\mu\text{g/mL}$). Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) was used at a concentration of 1 μM for THP1 cells stimulation. HDL were added to the culture medium to a final concentration of 0.4 mg protein/mL. Incubation was then carried out for 0 to 48 hours at 37° C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. At the end of each incubation time, samples were centrifuged (at 500g for 10 min at 4°C) and the supernatant was analyzed immediately for lipid peroxide formation.

Copper-induced HDL oxidation. HDL were incubated for the indicated periods at 37° C in 10^{-2} mM in sodium phosphate buffer pH 7, containing 10 μM cupric sulfate.

Oxidation reactions were stopped by simply cooling in an ice bath without EDTA addition and the lipid peroxides formed were measured immediately.

γ -Radiolysis-induced HDL and/or LDL oxidation. γ -Irradiations were carried out in a ^{60}Co Gamma cell 220 (Atomic Energy of Canada Ltd.). Irradiations were performed as previously described [10]. The initial dose-rate was 0.086 Gy/s as determined by Fricke [11]. In brief, HDL and/or LDL (2 mL in each tube) were irradiated in aerated aqueous solutions containing 10^{-2} M sodium phosphate buffer at pH 7.0. Under these conditions, the main radical species formed are hydroxyl and superoxide anion radicals with respective yields of $2.8 \times 10^{-7} \text{ mol J}^{-1}$ and $3.4 \times 10^{-7} \text{ mol J}^{-1}$ [12].

Assessment of LDL and HDL oxidation. HDL and/or LDL peroxidation was followed by measuring lipid peroxide formation according to the method of el-Saadani *et al.* [13]. The working reagent was prepared in our laboratory as described [14]. Lipid peroxidation was also measured by monitoring the absorption at 234 nm [15]. Results obtained were in the same range as those obtained for lipid peroxide formation. These data are not shown in order to avoid redundancy.

Evaluation of the antioxidant effect of HDL towards LDL oxidation. The antioxidant effect of HDL towards LDL oxidation was evaluated by subtracting the amounts of lipid peroxide formed in HDL oxidized alone from those formed in the mixtures (LDL + HDL) as already described [16]. The oxidized form of HDL (oxHDL) was also tested for its

antioxidant effect. Native HDL (nHDL) as well as oxHDL were mixed with LDL at a ratio of LDL/HDL 0.1/0.2 mg protein/ml.

Electrophoretic mobility. The antioxidant effect of HDL towards LDL oxidation was also evaluated by measuring the electrophoretic mobility of LDL submitted to oxidative conditions in the absence or presence of HDL (nHDL or oxHDL). Electrophoretic mobility was measured using 5 μ l of each sample as already described [17].

HDL PON activity. PON1 paraoxonase (p.ase) activity was measured by the initial velocity of paraoxon hydrolysis, at 25° C, to yield *p*-nitrophenol at 412 nm ($\epsilon_{412 \text{ nm}} = 18290 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [17]. A PON1 activity of 1 U/L was defined as 1 μ M of *p*-nitrophenol formed per min. Results are expressed in U/mg protein. The phenotype of each subject was determined by an enzymatic method [19]. Six individuals were of phenotype A, 3 were AB and 1 was of phenotype B.

Statistical analysis. Results are presented as pooled data from 10 independent experiments (means \pm SD), performed in duplicate. Mean values were compared using the student's *t*-test, to detect significant differences. The relationships between the parameters were determined by regression and correlation analysis. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

THP1 cell-induced HDL oxidation

We initially studied oxidation of HDL induced by THP1-cells and evaluated the activity of PON1 to hydrolysis paraoxon (p.ase activity) at different stages of HDL oxidation. LP formation increased with the incubation time ($v = 0.19 \pm 0.03$ nmol/mg protein/min) and tapered off between 30 and 48 hours (Fig. 1). HDL incubated in medium alone without cells were used as reference and very low amounts of LP were detected in this case (Fig. 1). In parallel, we studied the activity of PON1 towards paraoxon hydrolysis. Incubation of HDL with THP1 cells resulted in a diminution in the PON1 activity (Fig. 1). PON1 alteration was expressed as a percent reduction in its p.ase activity with respect to its initial value. PON1 p.ase activity decreased with a rate of -0.05 %/min and lost approximately 65 ± 5 % of its total activity after 30 to 48 hours of HDL incubation with cells. This corresponds to the incubation time of maximum lipid peroxide formation. A reduction in PON1 activity was also observed when HDL were incubated with medium Ham's F-10 alone (without cells). Although this was to a lesser extent (approximately a decrease of 18 % after 48 hours) and with an activity decrease-rate of -0.91×10^{-2} /min. It should be noted that Ham's F-10 medium contains traces of ion metals: 10 nM cupric sulfate and 3 μ M ferrous sulfate (according to the product notice).

Copper induced HDL oxidation

HDL were incubated with copper ions at a concentration 10 μ M. Oxidation was followed as a function of the incubation time (0 to 24 hours). Fig. 2 shows LP formation curves obtained during HDL oxidation. Incubation of HDL with Cu^{2+} induces a sharp

increase in LP formation for the first minutes of incubation with a rate of -0.25 ± 0.03 nmol/mg protein/min). This value is slightly higher than the value obtained in the presence of THP1 cells (Table 1). Also, the maximum LP formed is 2.5 higher than that in the presence of cells (127.12 ± 13.52 nmol/mg protein vs. 51.93 ± 4.72 nmol/mg protein). Moreover the PON1 p.ase activity decreased dramatically upon incubation of HDL with copper ions. The velocity of PON1 activity decrease was about -1.35 ± 0.09 %/min, which is 240 times higher than in the presence of THP1. At the longer incubation time, 6 to 24 hours, less than 3.8% of the initial PON1 p.ase activity was still expressed by HDL.

HDL oxidation induced by $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2\cdot^-$ free radicals produced by γ -radiolysis

For better elucidating the mechanism of loss of PON1 p.ase activity during HDL oxidation, we used an oxidation system, which contained neither cells nor metal ions. We thus applied the method of γ -radiolysis of water to produce $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2\cdot^-$ oxygen free radicals with respective yields equal to 2.8×10^{-7} and 3.4×10^{-7} mol.J⁻¹. Phosphate buffer solutions were prepared from tridistilled water and thereafter treated with chelex and the ascorbate test was applied to ensure a complete absence of metals ions [20]. HDL, at a concentration 0.4 mg/ml in 10^{-2} M phosphate buffer (pH 7.0), were submitted to γ -irradiation at a dose-rate of 0.086 Gy/s with total final doses between 0 and 200 Gy. Results are expressed as lipid peroxide formed and PON1 p.ase activity as a function of irradiation time in order to permit the comparison with results obtained with THP1 cells or copper-induced HDL oxidation. LP formation and PON1 activity degradation increased dramatically with radiation time (radiation dose) corresponding respectively to

a rate constant equal to 4.69 ± 0.04 nmol/mg protein/min and -4.31 ± 0.02 %/min (Fig. 3). These values are very high when compared to those obtained during chemical oxidation (incubation with copper) or in THP1 cell-induced HDL oxidation.

Even if the rate of HDL oxidation is very high, when compared to oxidation induced by copper, the maximum LP formed at the higher radiation dose is low, 112.56 ± 8.36 vs. 127.12 ± 13.52 nmol/mg protein. Moreover, PON1 p.ase activity decreased by only 48% at the maximum radiation time applied vs. about 94% induced by copper oxidation after 24 hours of incubation. Enrichment of HDL with α -tocopherol (0.64 to 1.95 α -tocopherol per HDL particle) reduced lipid peroxide formation rates and PON1 activity degradation (Fig. 3, dot-line). Table 1 summarizes the principle results obtained for HDL lipid peroxidation and PON1 p.ase activity degradation rates under the different conditions cited above.

We subsequently investigated whether there is a relationship between the kinetics of oxidation products formed within HDL and the PON1 decreasing activity. Our results shown a strong and significant correlation between the rates of LP formation and percent decrease of PON1 p.ase inactivation ($r = 0.93$ $p < 0.0054$).

PON1 (p.ase) activity degradation and HDL antioxidant properties

In the second part of our study we were interested in investigating the effect of PON1 p.ase activity degradation on the antioxidant protective effect of HDL on LDL oxidation. Thus, we initially studied the antioxidant effect of HDL under conditions where lipid peroxidation was initiated only by oxygen free radicals produced by γ -radiolysis. Thereafter, we studied the properties of HDL, in their native (nHDL) and oxidized form

(oxHDL), towards LDL oxidation induced in the same conditions *i.e.* γ -radiolysis. HDL oxidized by THP1 cells or by copper ions were dialyzed, before incubation with LDL, to ensure complete elimination of free copper ions contained in the oxidation medium.

Oxidation of HDL reduces their ability to protect LDL (Fig. 4A). This reduction in HDL antioxidant activity was dependent on the extent of their oxidation before incubation with LDL as judged by the value of plateau of the curves (Figures 1, 2 and 3). Considering that the maximum of HDL oxidation corresponded, in our case, to the maximum reached for LP formation we can then suggest that the more oxidized the HDL, the weaker the antioxidant effect. Thus, HDL incubated for 20 to 30 hours with copper ions show less antioxidant protection than HDL oxidized in the presence of THP1 cells for the same time or than HDL completely oxidized (for 38 min) by γ -radiolysis. The percentage of HDL protection against LDL oxidation were, respectively equal to 12.03 ± 6.10 ($p < 0.03$), 22.03 ± 5.93 ($p < 0.01$) and 46.01 ± 5.61 ($p < 0.01$), (expressed as a percentage by which LDL oxidation was reduced) (Fig. 4A). The antioxidant effect of nHDL and oxHDL was strongly and significantly correlated with the associated PON1 p.ase activity ($r = 0.95$ $p < 0.04$) (Fig. 4B).

Study of the antioxidant protective effect of HDL in their native and oxidized forms towards Apo B apolipoprotein, forming LDL, was also studied by measuring the electrophoretic mobility of LDL under the different conditions cited above. The results obtained have the same tendency as for lipid peroxide formation (Table 2). Apo-B modification increased with the extent of HDL oxidation. oxHDL oxidized by copper ions gave low protection when compared to oxHDL oxidized by cells or by γ -radiolysis even if they were all oxidized to their maximum.

DISCUSSION

Evidence suggests that the antioxidant effect of HDL is principally assumed by one of the HDL-associated enzymes, PON1. PON1 confers its antioxidant effect also towards HDL during their oxidation [21-24]. The question thus arises as to the antioxidative property of PON1 during oxidative stress conditions under which HDL are also oxidized. Moreover, the PON1 antioxidant protective effect tested *in vitro* during HDL or LDL oxidation initiated by copper ions as initiators of oxidation is complicated [25]. Indeed, during these experiments PON1 activity may be affected by Ca^{++} displacement induced by copper ions [26]. Thus, we have attempted to address this question by investigating the effect of HDL oxidation, induced under different conditions, on PON1 enzymatic activity (paraoxonase activity) and its effect on the antioxidant property of HDL.

PON1 activity (arylesterase activity) has already been studied under oxidative conditions and was also shown to be reduced in the presence of oxLDL and/or during oxidation of LDL induced by copper [27]. However it is more judicious to investigate the activity of PON1 directly in its natural site within HDL. Indeed, PON1 is entirely complexed to these lipoproteins in serum [28]. Moreover, under oxidative stress conditions, HDL constitute a target for oxidative modifications that may affect their antioxidant properties. It should also be noted that PON1 activity is strongly dependent on its stability, which is enhanced in a phospholipid environment and in association with Apo AI apolipoprotein [21,29]. Thus, due to the difference in lipid/protein composition between LDL and HDL, the kinetics of PON1 inactivation may be different when it is associated with HDL or simply used as a supplement to solutions of LDL [30].

In our oxidation systems, PON1 p.ase activity degradation, during HDL oxidation, occurs in the presence of copper ions as well as in their absence (by γ -radiolysis). PON1 p.ase activity was completely inhibited in HDL isolated in the presence of EDTA. Although the antioxidative properties of these HDL was only slightly reduced, 59.09 ± 5.12 ($p < 0.01$) vs. 48.04 ± 7.23 ($p < 0.04$) respectively. This result clearly suggests that PON1 may not be the only mechanism by which HDL inhibits LDL oxidation [31]. Our results show a significant and positive correlation between the rate of PON1 p.ase inactivation and lipid peroxidation rates ($r = 0.93$ $p < 0.0054$) which demonstrate that lipid peroxidation products contribute to the PON1 inactivation. However, even for a slight difference in the amount of lipid peroxides formed, at the plateau, during HDL oxidation induced by copper or by γ -radiolysis (127.0 ± 13.52 vs. 112.56 ± 8.36 nmol/mg protein respectively) loss of PON1 p.ase activity was more dramatic in copper-induced HDL oxidation system. Accordingly, it is possible that PON1 inactivation would also result from a conformational change and/or decreased stability due to Ca^{++} displacement [32,33]. Thus, in copper-induced HDL oxidation systems, PON1 inactivation could be due to both Ca^{++} displacement, induced by copper, and also by lipid peroxides formed during HDL oxidation. The effect of copper ions on PON1 could not be limited to Ca^{++} displacement but may also interact with amino acids in the active site. Besides this, we can not exclude that the inactivation of PON1 towards its antioxidant effect may result from direct free radicals attack on the amino acid groups localized at the active site of the enzyme such as Trp280 as suggested by Aviram *et al.* [26]. Oda *et al.* demonstrated recently that an alteration of cysteine amino acid on the N-terminal portion of Apo AI could induce a reduction in the PON enzymatic activity [34]. On the basis of this, it is

probable that the reduction in PON1 p.ase activity during HDL oxidation may be associated with Apo A1 oxidation. Although, the effect of lipid peroxidation on PON1 inactivation should be greater than Ca^{++} displacement or other mechanism affecting PON1 activity and this is supported by the strong and significant correlation between rates of lipid peroxide formation and PON1 inactivation.

α -Tocopherol-enriched oxHDL (3ox-HDL-vit. E) showed an increased antioxidant activity towards LDL oxidation when compared to 3oxHDL (without α -tocopherol enrichment). Analysis of the α -tocopherol contained within 3ox-HDL, the oxidized form of α -tocopherol-enriched HDL, showed that α -tocopherol content was still higher, about 2-fold, in comparison to nHDL (results not shown). Thus, it is possible that α -tocopherol was transferred from HDL to LDL during incubation and thus participates in the protection of LDL against oxidation.

Our results show a significant and positive correlation between PON1 p.ase inactivation and the antioxidant ability of HDL to protect LDL ($r = 0.95$, $p < 0.04$) (Fig. 4B). Although, it is well known that the antioxidant activity of HDL is due only in part to the PON1 and other HDL components participate in this activity among them, platelet activating factor acetylhydrolase (PAF-AH), lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT), cholesteryl ester transfer protein (CETP) and Apo A1 [35]. Thus, our results suggest an alteration of all HDL components during HDL oxidation and these alterations are with the same extents than those induced to PON1. Thus, the percentage of PON1 inactivation can be used as an indicator of HDL antioxidant capacity.

In summary, HDL oxidation, as evaluated by lipid peroxide formation, is accompanied by an alteration in the PON1 p.ase activity and reduction in the antioxidant properties of

HDL towards LDL oxidation. The degradation of PON1 p.ase activity and loss of HDL antioxidant ability was strongly and significantly correlated. The loss of PON1 activity in oxidized HDL may be relevant *in vivo* and could have a dramatic impact in the development and progression of atherosclerosis in patho-physiological situations where plasma paraoxonase activity was shown to decrease.

ACKNOWLEDGMENTS:

We are indebted to Mrs. Lise Trottier for her help of our statistic analysis. This work was supported in part by a grant from Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and grant-in-aid from Agence Universitaire de la Francophonie - (AUF). This support is gratefully acknowledged. A. Khalil is a junior 1 fellow of FRSQ.

REFERENCES:

- [1] M.I. Mackness, S. Arrol, C.A. Abbott, P.N. Durrington (1993) Is paraoxonase related to atherosclerosis. *Chemico Biological Interactions*, 87, 161–171.
- [2] A.D. Watson, J.A. Berliner, S.Y. Hama, B.N. La Du, K.F. Faull A.M.Fogelman, M. Navab (1995) Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *Journal of Clinical Investigation*, 96, 882-2891.
- [3] M.J. Burkitt (2001) A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, alpha-tocopherol, thiols, and ceruloplasmin. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 394, 117-35.
- [4] J. McElveen, M.I. Mackness, C.M. Colley, T. Peard, S. Warner, C.H. Walker (1986) Distribution of paraoxon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction. *Clinical Chemistry*, 32, 671-3.
- [5] O. Hasselwander, D. McMaster, D.G. Fogarty, A.P. Maxwell, D.P. Nicholls, Young I.S. (1998) Serum paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase in chronic renal failure. *Clinical Chemistry*, 44, 179-81.
- [6] R.W. James, I. Leviev, A. Righetti (2000) Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 101, 2252-7.
- [7] B. Mackness, P.N. Durrington, A.J. Boulton, D. Hine, M.I. Mackness (2002) Serum paraoxonase activity in patients with type 1 diabetes compared to healthy controls, *European Journal of Clinical Investigation*, 32, 259-64.
- [8] C. Miloshevitich, A. Khalil (2001) Study of the paraoxonase and platelet-activating factor

acetylhydrolase activities with aging. *Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids*, 65, 241-6.

[9] W. Sattler, D. Mohr, R. Stocker (1994) Rapid isolation of lipoproteins and assessment of their peroxidation by high-performance liquid chromatography postcolumn chemiluminescence. *Methods in Enzymology*, 233, 469-89.

[10] A. Khalil, J.R. Wagner, G. Lacombe, V. Dangoisse, T. Jr. Fulop (1996) Increased susceptibility of low-density lipoprotein (LDL) to oxidation by gamma-radiolysis with age. *FEBS Letters*, 392, 45-8.

[11] H. Fricke, S. Morse (1927) The chemical action of Röntgen rays on dilute ferrosulfate solutions as a measure of dose. *American Journal of Roentgenology, Radium Therapy & Nuclear Medicine*, 18, 430-432.

[12] J.W.T. Spinks, R.J. Woods (1990) *An introduction to radiation chemistry*, 3rd ed Wiley-Interscience New York.

[13] M. el-Saadani H., Esterbauer, M. el-Sayed, M. Goher, A.Y. Nassar, G. Jurgens (1989) A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. *Journal of Lipid Research*, 30, 627-30.

[14] A. Khalil, J.P. Fortin, J.G. LeHoux, T. Fulop (2000) Age-related decrease of dehydroepiandrosterone concentrations in low density lipoproteins and its role in the susceptibility of low density lipoproteins to lipid peroxidation. *Journal of Lipid Research*, 41, 1552-61.

[15] D. Bonnefont-Rousselot, C. Motta, A. Khalil, R. Sola, A.E. La Ville, J. Delattre, M. Gardes-Albert (1995) Physicochemical changes in human high-density lipoproteins (HDL) oxidized by gamma radiolysis-generated oxyradicals. Effect on their cholesterol effluxing capacity. *Biochimica Biophysica Acta*, 1255, 23-30.

- [16] S.M. Sanguinetti, F.D. Brites, V. Fasulo, J. Verona, A. Elbert, R.L. Wikinski, L.E. Schreier (2001) HDL oxidability and its protective effect against LDL oxidation in Type 2 diabetic patients. *Diabetes, Nutrition & Metabolism - Clinical & Experimental*, 14, 27-36.
- [17] A. Khalil, J.G. Lehoux, R.J. Wagner, O. Lesur, S. Cruz, E. Dupont, J.P. Jay-Gerin, J. Wallach, T. Fulop (1998) Dehydroepiandrosterone protects low density lipoproteins against peroxidation by free radicals produced by gamma-radiolysis of ethanol-water mixtures. *Atherosclerosis*, 36, 99-107.
- [18] K.N. Gan, A. Smolen, H.W. Eckerson, B.N. La Du (1991) Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metabolism & Disposition*, 19, 100-6.
- [19] H.W. Eckerson, J. Romson, C. Wyte, B.N. La Du (1983) The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts. *American Journal of Human Genetics*, 35, 214-27.
- [20] G.R. Buettner (1990) Methods *Enzymol.* Use of ascorbate as test for catalytic metals in simple buffers. *Methods in Enzymology*, 186, 125-128.
- [21] M. Aviram, M. Rosenblat, C.L. Bisgaier, R.S. Newton, S.L. Primo-Parmo, B.N. La Du (1998) Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *Journal of Clinical Investigation*, 101, 1581-90.
- [22] D.M. Shih, Y.R. Xia, X.P. Wang, E. Miller, L.W. Castellani, G. Subbanagounder, H. Cheroutre, K.F. Faull, J.A. Berliner, J.L. Witztum, A.J. Lusis (2000) Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Journal of biological chemistry*, 275, 17527-35.

- [23] Z. Ahmed, A. Ravandi, G.F. Maguire, A. Emili, D. Draganov, B.N. La Du, A. Kuksis, P.W. Connelly (2001) Apolipoprotein A-I promotes the formation of phosphatidylcholine core aldehydes that are hydrolyzed by paraoxonase (PON-1) during high density lipoprotein oxidation with a peroxynitrite donor. *Journal of biological chemistry*, 276, 24473-81.
- [24] M. Navab, S.Y. Hama, C.J. Cooke, G.M. Anantharamaiah, M. Chaddha, L. Jin, G. Subbanagounder, K.F. Faull, S.T. Reddy, N.E. Miller, A.M. Fogelman (2000) Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *Journal of Lipid Research*, 41, 1481-94.
- [25] Y. Ikeda, T. Suehiro, M. Inoue, Y. Nakauchi, T. Morita, K. Arai, H. Ito, Y. Kumon, K. Hashimoto (1998) Serum paraoxonase activity and its relationship to diabetic complications in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 47, 598-602.
- [26] M. Aviram, S. Billecke, R. Sorenson, C. Bisgaier, R. Newton, M. Rosenblat, J. Erogul, C. Hsu, C. Dunlop, B. La Du (1998) Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology*, 18, 1617-24.
- [27] M. Aviram, M. Rosenblat, S. Billecke, J. Erogul, R. Sorenson, C.L. Bisgaier, R.S. Newton, B. La Du (1999) Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radicals Biology & Medicine*, 26, 92-904.
- [28] M.C. Blatter, R.W. James, S. Messmer, F. Barja, D. Pometta, Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase, *European Journal of Biochemistry*, 211, 871-9.
- [29] C.A. Abbott, M.I. Mackness, S. Kumar, A.J. Boulton, P.N. Durrington (1995) Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins, *Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology*, 15, 1812-8.

- [30] D. Josse, P. Masson (2001) Human plasma paraoxonase (HuPON1): an anti-atherogenic enzyme with organophosphate hydrolase activity. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 59, 108-18.
- [31] D.L. Tribble, B.M. Chu, E.L. Gong, F. van Venrooij, A.V. Nichols (1995) HDL antioxidant effects as assessed using a nonexchangeable probe to monitor particle-specific peroxidative stress in LDL-HDL mixtures. *Journal of Lipid Research*, 36, 2580-9.
- [32] P.N. Durrington, B. Mackness, M.I. Mackness (2001) Paraoxonase and atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology*, 21, 473-80.
- [33] C.L. Kuo, B.N. La Du (1998) Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity. *Drug Metabolism & Disposition*, 26, 653-60.
- [34] M.N. Oda, J.K. Bielicki, T. Berger, T.M. Forte (2001) Cysteine substitutions in apolipoprotein A-I primary structure modulate paraoxonase activity. *Biochemistry* 40, 1710-8
- [35] M. Navab, J.A. Berliner, G. Subbanagounder, S. Hama, A.J. Lusis, L.W. Castellani, S. Reddy, D. Shih, W. Shi, A.D. Watson, B.J. Van Lenten, D. Vora, A.M. Fogelman, HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology*, 21, 481-8.

Legends to figures

- Figure 1:** Lipid peroxide formation and PON1 p.ase activity during HDL oxidation induced by THP1 monocyte-like cells. See text for details.
- (■, □) Lipid peroxides formation and (●, ○) PON1 p.ase activity in HDL incubated with THP1 cells or in medium alone respectively. Each value is the mean \pm standard deviation of 10 different experiments.
- Figure 2:** Lipid peroxide formation and PON1 p.ase activity during HDL oxidation induced by copper ions. See text for details.
- Lipid peroxide formation (■), PON1 p.ase activity (●). Each value is the mean \pm standard deviation of 10 different experiments.
- Figure 3:** Lipid peroxide formation and PON1 p.ase activity during HDL oxidation induced by $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ free radicals generated by γ -radiolysis. HDL were used as native or after α -tocopherol enrichment (α -Toc/HDL particle was increased by about 3 fold).
- (■, □) Lipid peroxide formation and (●, ○) PON1 p.ase activity in native and α -tocopherol-enriched HDL respectively. Each value is the mean \pm standard deviation of 10 different experiments.

Figure 4:

A: Effect of HDL oxidation on its antioxidant activity towards LDL oxidation. LDL were oxidized alone or in presence of native (nHDL) and oxidized HDL (oxHDL). 1oxHDL, 2oxHDL, 3oxHDL corresponded to HDL fully oxidized (at the plateau) by copper ions (10 μ M), THP-1 monocyte-like cells or by γ -radiolysis. 3oxHDL + vit.E corresponded to fully oxidized α -tocopherol enriched-HDL (38 min of irradiation). Results are given as mean SD (n = 5), * p < 0.01, ** p < 0.03, *** P < 0.04.

B: Correlation of PON1 p.ase activity and HDL antioxidant protection towards LDL oxidation. Results are given as mean \pm SD (n = 10).

Fig. 1

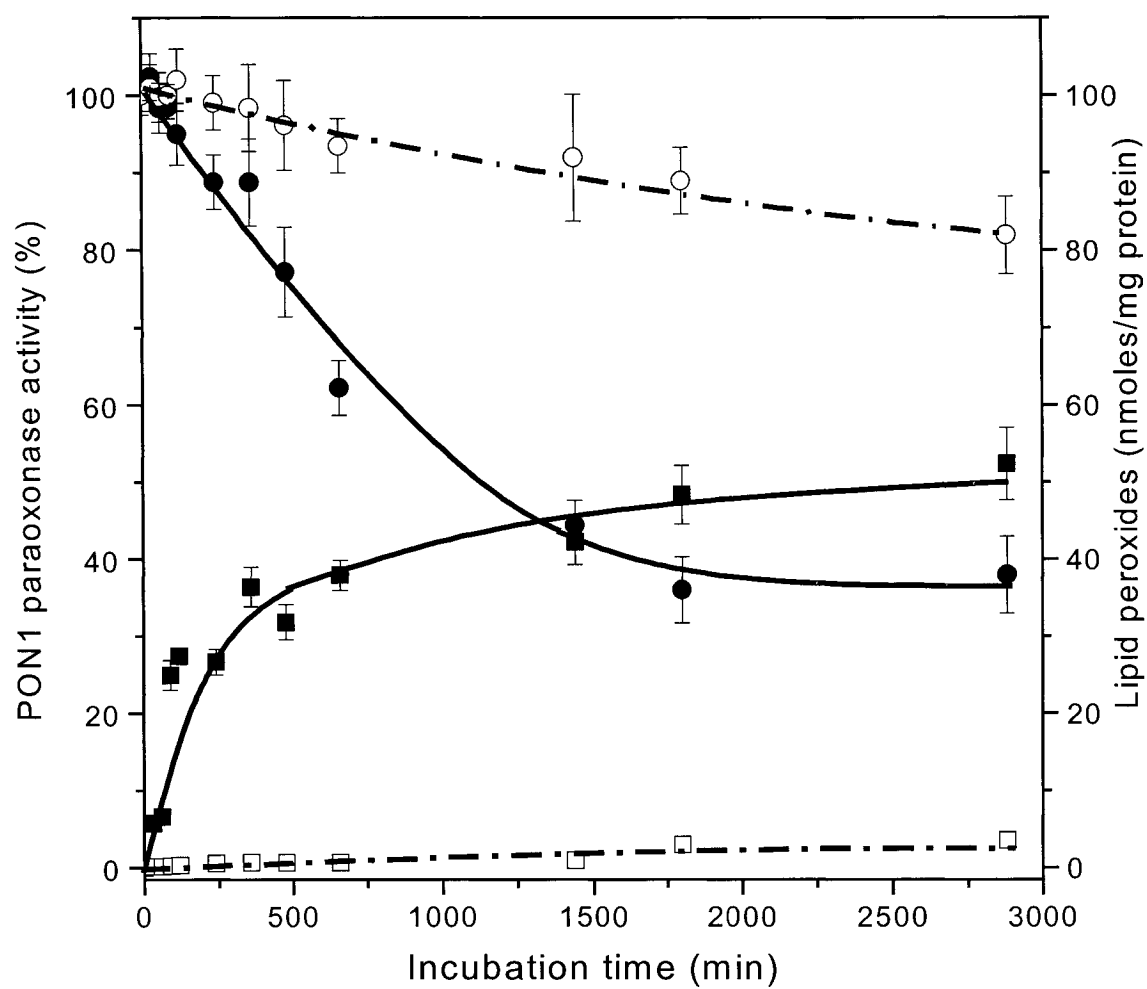


Fig. 2

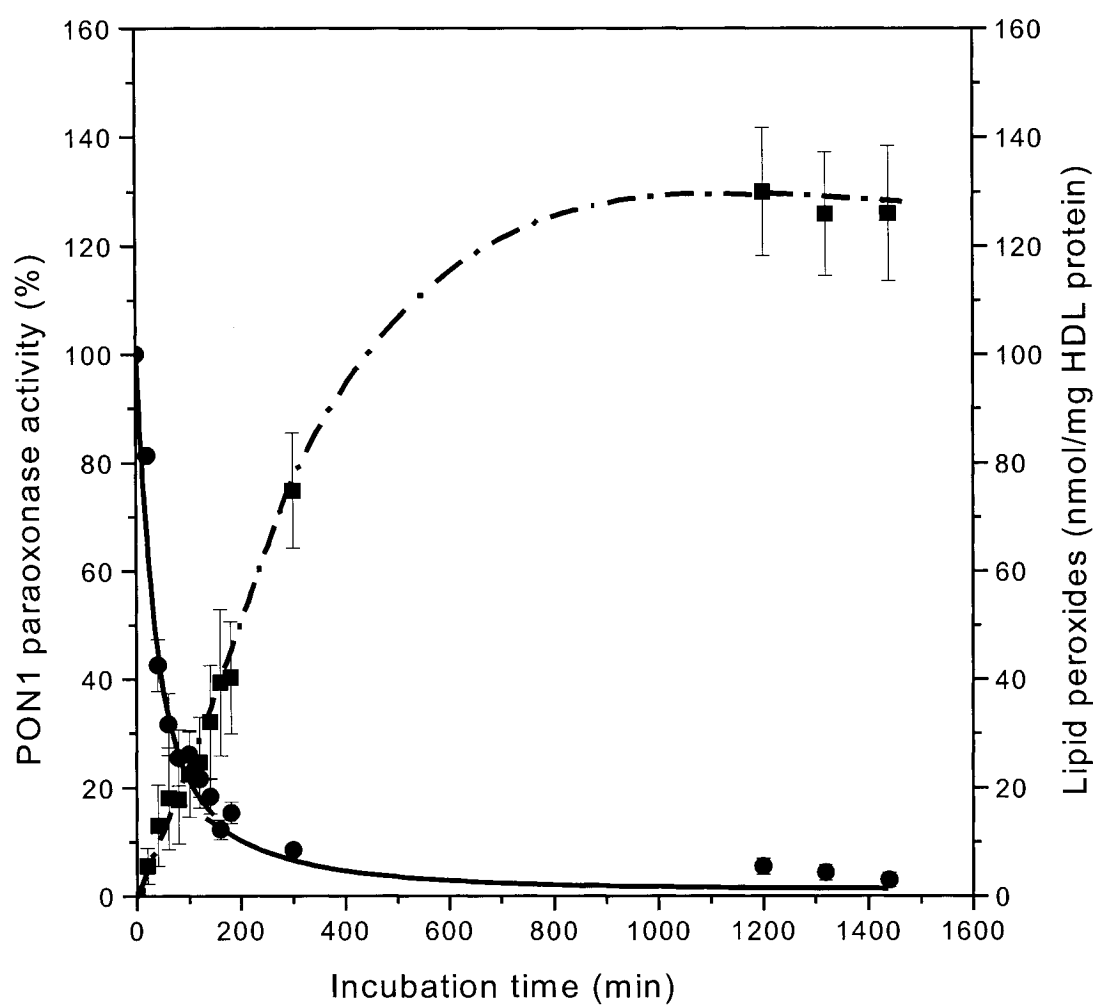


Fig. 3

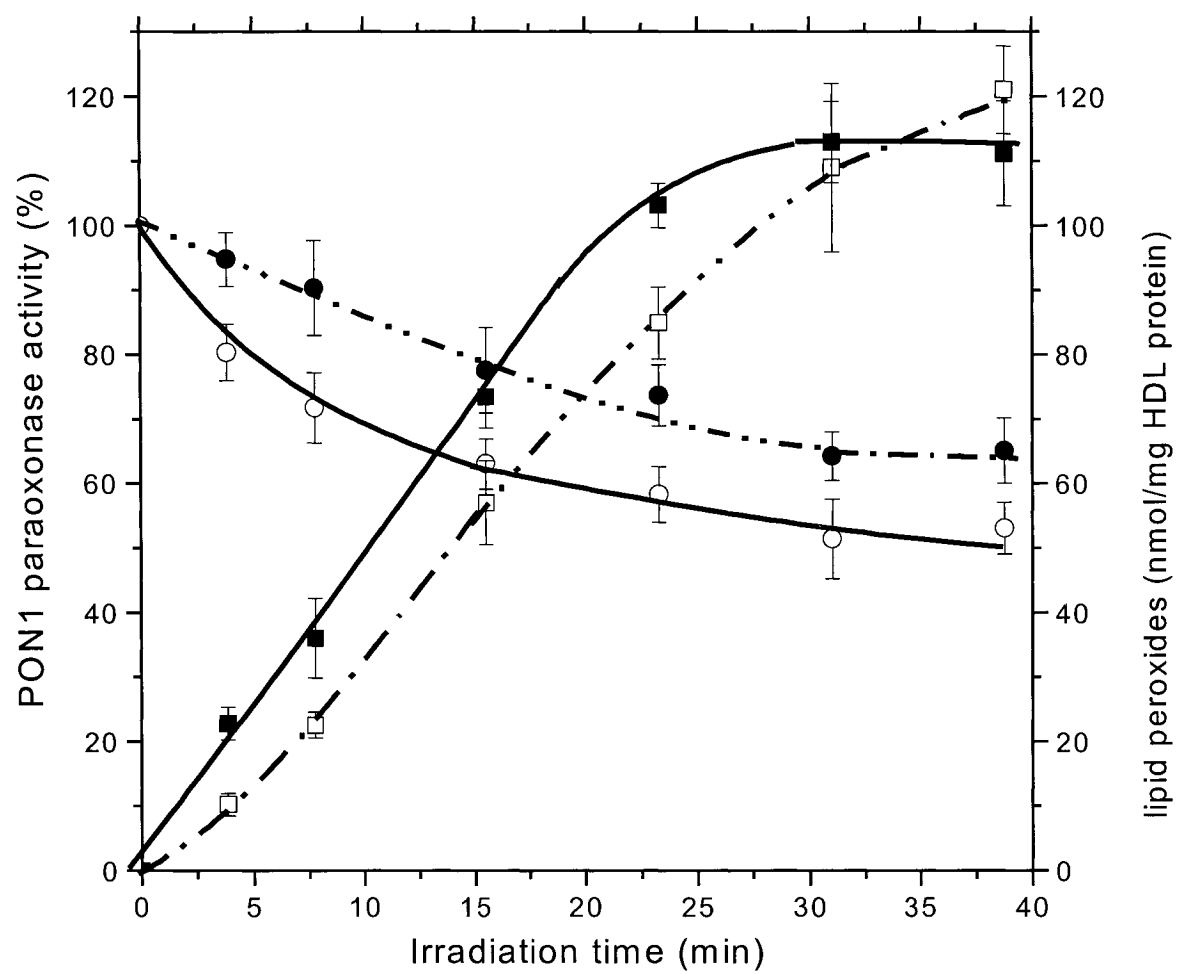


Fig. 4

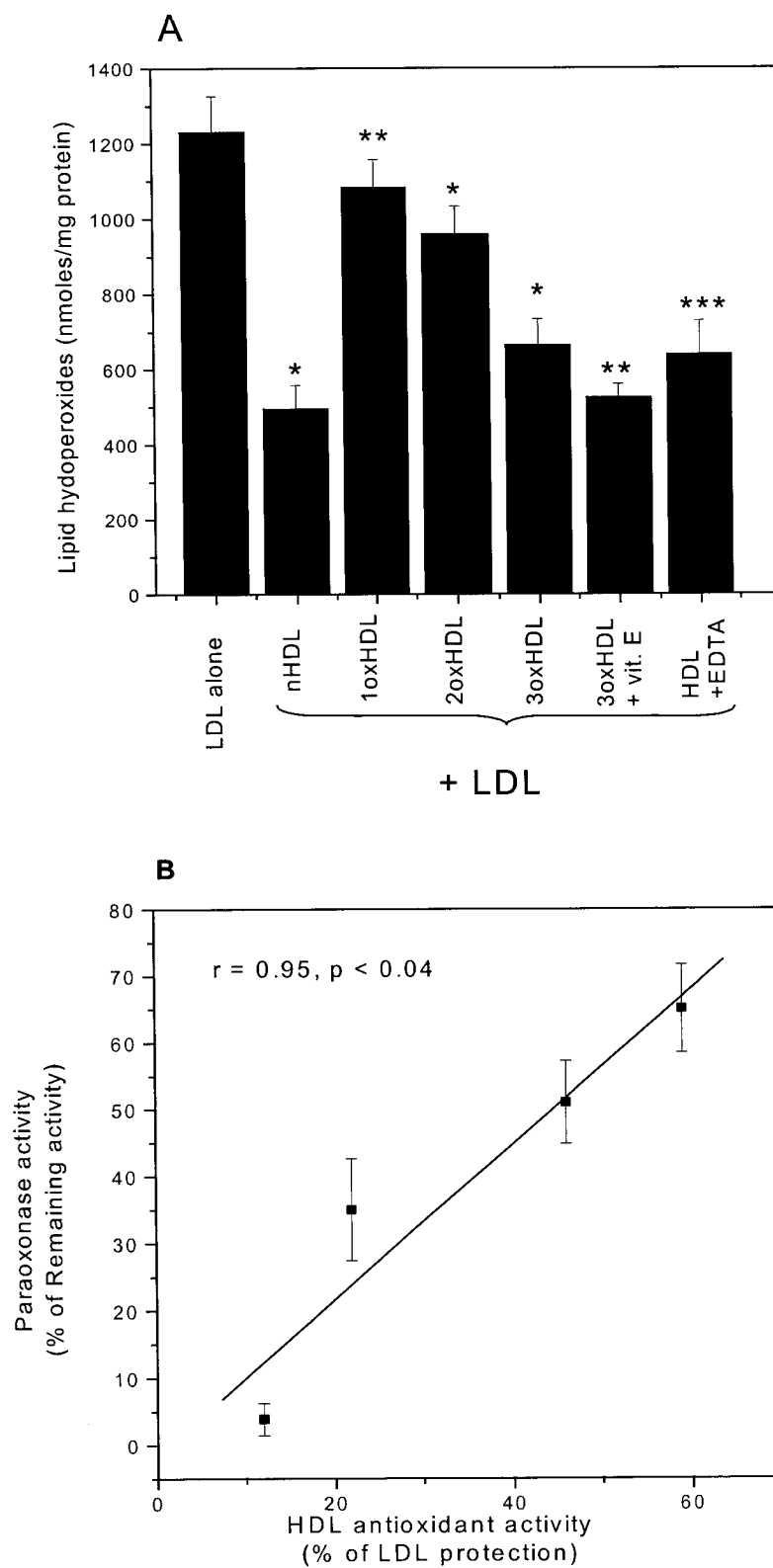


Table 1: Kinetic parameters of HDL oxidation and PON1 p.ase activity as a function of oxidant system.

	v_{LP} nmoles/mg/min	- %PON (%/min)	<u>[LP]_{plateau}</u> (nmol/mg protein)	<u>%PON</u> <u>remaining</u>
THP1	0.19 ± 0.03	$- 0.05$	51.93 ± 4.72	$35.37 \pm 5.07 \%$
	n.a.	$- 0.91 \times 10^{-2}$		$82.12 \pm 4.94 \%$
Copper (10 μ M)	0.25 ± 0.03	$- 1.35 \pm 0.09$	127.12 ± 13.52	$3.81 \pm 2.12 \%$
γ - (-vit.E)	4.69 ± 0.04	$- 4.31 \pm 0.02$	112.56 ± 8.36	$51.92 \pm 5.84 \%$
γ - (+vit.E)	2.58 ± 0.19	$- 1.72 \pm 0.03$	n.a.	$65.25 \pm 4.97 \%$

Table 2 : Oxidative modification of LDL as determined by the electrophoretic mobility

Band	Relative electrophoretic mobility compared to LDL control.
control LDL (0 Gy)	1
LDL alone (200 Gy)	2.5
LDL + nHDL (200 Gy)	1.2
LDL + ox1HDL (200 Gy)	2.3
LDL + ox2 HDL (200 Gy)	1.9
LDL + ox3HDL (200 Gy)	1.6
LDL + ox3HDL + vit.E (200 Gy)	1.3
LDL + EDTA-HDL (200 Gy)	1.8

Data are expressed as the relative electrophoretic mobility of each band compared to that of the control (native) LDL band. LDL were oxidized alone or in the presence of native or modified HDL. Legends are the same as for Fig. 4.

2.2 Lien entre les deux articles

À la lumière des résultats obtenus, nous pouvons conclure que l'oxydation des HDL induit la diminution de leurs activités reliées à l'enzyme paraoxonase et les rend incapables de protéger les LDL de l'oxydation, ce qui suggère que le stress oxydatif pourrait avoir des effets délétères sur la structure et la fonction des HDL in vivo.

Cette constatation est importante du moment qu'il existe une corrélation inverse entre le niveau du stress oxydatif (balance entre les systèmes antioxydants et pro-oxydants) et l'âge. Ce désordre contribue à l'apparition des maladies reliées au vieillissement telle que l'athérosclérose (FINKEL et HOLBROOK, 2000) (HALLIWELL et al, 1992).

Les résultats de ce travail permettent de montrer pour la première fois que l'activité paraoxonase de la PON1 est un indicateur du potentiel antioxydant des HDL. Ainsi, la diminution de l'activité paraoxonase avec l'âge rapporté par (MILOCHEVITCH et KHALIL, 2001) et (SERES et al. 2004) serait un indicateur de l'altération du potentiel antioxydant des HDL. Nous proposons, dans la partie qui suit, d'étudier l'activité antioxydante des HDL au cours du vieillissement et aussi d'étudier l'activité de la PON1 dans des conditions de stress oxydatif in vitro.

2.3 Article 2: Age-related decrease in high-density lipoproteins antioxidant activity is due to an alteration in the PON1's free sulfhydryl groups

Article sous presse dans la revue *Atherosclerosis* juin 2005.
Inclus dans le mémoire avec la permission des auteurs en juillet 2005.

Leila Jaouad, Chantal de Guise, Hicham Berrougui, Martin Cloutier, Maxim Isabelle

Tamas Fulop, Hélène Payette, Abdelouahed Khalil

Résumé de l'article:

L'objectif de cette étude est de déterminer l'effet de l'âge sur les propriétés antioxydantes des HDL et de l'enzyme PON1.

Il s'agit d'une étude comparant l'activité antioxydante des HDL et de la PON1 chez des sujets en bonne santé jeunes et âgés. Les LDL ainsi que les HDL sont séparées par ultracentrifugation, l'oxydation des lipoprotéines est effectuée par les radicaux libres HO/O_2^- produits par radiolyse gamma de l'eau. L'analyse des produits de la peroxydation lipidique est effectuée par différentes techniques: spectrophotométrie d'absorption (mesure des diènes conjugués et des hydroperoxydes) et la chromatographie liquide de haute performance (mesure du malondialdéhyde).

Nos résultats démontrent que les HDL des sujets âgés protègent moins les LDL de l'oxydation en comparaison aux HDL des sujets jeunes.

De la même manière, la PON1 purifiée du plasma des sujets âgés montre une plus faible activité antioxydante par rapport à la PON1 purifiée du plasma des sujets jeunes; l'accumulation des diènes conjugués est de 78.14% versus 47.08% ($p < 0.001$) respectivement. L'exposition de l'enzyme PON1 purifiée à l'action des radicaux libres

produits par radiolyse gamma de l'eau, altère significativement son activité antioxydante et réduit le nombre des groupements thiols (SH) libres contenus dans la PON1.

Age-related decrease in high-density lipoproteins antioxidant activity is due to an alteration in the PON1's free sulfhydryl groups

Leila Jaouad^a, Chantal de Guise^a, Hicham Berrougui^a, Martin Cloutier^a, Maxim Isabelle^a

Tamas Fulop^a, Hélène Payette^a, Abdelouahed Khalil^{a,b,*}

^aCentre de Recherche sur le vieillissement, Institut Universitaire de Gériatrie de Sherbrooke, ^bDépartement de médecine, service de gériatrie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada, J1H4C4.

*Address correspondence to: Abdelouahed Khalil Ph.D., Research Centre on Aging, 1036 Belvedere South, Sherbrooke (QC) J1H4C4, Canada. Tel: 1 (819) 829-7131; Fax: 1 (819) 829-7141; E-Mail: Abdelouahed.Khalil@USherbrooke.ca

Abstract:

The aim of this study was to evaluate the antioxidant activity of HDL with aging and to investigate the implication of PON1 in this process. The study involved 54 healthy subjects distributed in 2 age groups, young (20 to 25 years) and elderly (65 to 85 years). Lipid peroxidation was induced by $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ oxygen free radicals produced by γ -radiolysis of water. LDL oxidation was followed by the measurement of conjugated diene (CD), lipid peroxide (LP) and malondialdehyde (MDA) formation. PON1 was purified separately from young (Y-PON1) and elderly subjects (E-PON1). PON1 activity and structure was followed by measurement of PON1 paraoxonase (p.ase) activity, titration of the SH groups, and electrophoretic mobility by SDS-PAGE. Our results show a significant decrease in the HDL antioxidant activity: % of protection against CD formation = 27.70 % ($p < 0.01$) for E-HDL vs. 73.08% ($p < 0.001$) for Y-HDL. Moreover, E-PON1 showed a lower antioxidant activity when compared to Y-PON1 47.08% vs. 78.14%, respectively ($p < 0.0001$). Exposition of PON1 to $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ oxygen free radicals induced a significant decrease in PON1 p.ase activity as well as a reduction in the number of PON1's free sulfhydryl groups. Moreover, our results show a close association between PON1's free sulfhydryl groups and its capacity to protect LDL against lipid peroxidation. There was a significant decrease in the number of free sulfhydryls between Y-PON1 and E-PON1 with respect to Cysteine-284 amino acid residues ($p < 0.0092$).

Keywords: Paraoxonase, aging, HDL, oxygen free radicals, lipid peroxidation, antioxidant, sulfhydryl groups

Introduction

High-density lipoproteins (HDL) has long been known to be antiatherogenic but the exact mechanism of its action has yet to be identified. This atheroprotective effect is attributed to their role involved in the reverse transport of cholesterol and to their antioxidant properties. Paraoxonase1 (PON1), one of its associated enzymes, has been proposed to play a crucial role in the antioxidant activity of HDL (1).

PON1 is principally complexed with HDL in human serum (2). It has been reported that PON1 is implicated in the protection of LDL and HDL from oxidation induced by copper ions as well as by other free radical generators (3). This protection is most probably related to the ability of PON1 to hydrolyse some activated phospholipids (2) and/or lipid peroxide products (3). Aviram et al. showed that oxidized LDL inactivates PON1 arylesterase activity and decreases its ability to reduce LDL oxidation (4). The PON1 inactivation might result from an interaction of oxidised lipids, with PON1's free sulfhydryl group (4). Indeed, PON's free sulfhydryl at cysteine 284 is required for PON1's protection against LDL oxidation and is thought to be the active site for its antioxidant activity. Sorenson et al. showed that PON1 mutant of the cysteine free sulfhydryl group was resistant to inactivation by para-hydroxymercuribenzoate (PCMB), suggesting an important role of free thiols in PON1 (5). Furthermore, our group has demonstrated a decrease in the PON1 paraoxonase (p.ase) activity during HDL oxidation that was associated with a reduction in the antioxidant activity of HDL (6). More recently, purified PON1 p.ase activity was observed to decrease during Cu^{2+} /ascorbate or hypochlorite-induced oxidation (7) and also under oxidative stress-associated conditions such as in diabetes, which could also affect the antioxidant effect of PON1 (8).

In a previous study, we have demonstrated a decrease in PON1 p.ase activity with aging, which was not explained, by a decrease in the PON's plasma concentration nor by a change in the HDL circulating levels (9). On the other hand, our results suggested that increasing oxidative stress with aging could explain, in part, the observed reduction in PON1 activity in the elderly (9). Indeed, aging is accompanied by the development of oxidative stress conditions as evaluated by an increase in the circulating acute phase reactant, C-reactive protein (CRP) and the development of an inflammatory status (10,11). That change could be related to an increased risk for cardiovascular diseases (CVDs). Indeed, these biochemical modifications could affect PON1 activity and as a result lead to an increased susceptibility of HDL to lipid peroxidation in the elderly (10,12). Therefore, the reduction in the PON1 p.ase as well as in its antioxidant activity could negatively affect the atheroprotective properties of HDL in the elderly.

This study was aimed to evaluate, as a function of aging, the antioxidant property of HDL towards LDL oxidation induced by an accurate free radicals production method, i.e. gamma radiolysis. Secondly, we assessed the capacity of purified PON1 to protect LDL and investigated the effect of aging on its antioxidant activity. Thirdly, we investigated the implication of the PON1's free SH group (Cys-284) in the decrease of its antioxidant activity when PON1 is exposed to $\cdot\text{OH}/\text{O}_2\cdot^-$ and with aging.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Acetic acid, sulfuric acid, n-butanol, sodium phosphate, thiobarbituric acid, methanol and hexane were purchased from Fisher (Montréal, Qc), and 1,1,3,3-tetraethoxypropane, d α -tocopherol, dl α -tocopherol, ethylene glycol-bis(b-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), N-ethylmaleimide (NEM), benzalkonium chloride, ammonium molybdate, butylated hydroxy toluene (BHT), sodium dodecyl sulfate (SDS) and O,O-diethyl-O-p-nitrophenyl-phosphate (paraoxon) were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Dialysis bags were purchased from Spectrum Medical Industries Inc. (Houston, TX).

Subjects:

Fifty four healthy young (27 young subjects aged 20-25 years, mean age 23,9) and elderly subjects (27 elderly subjects aged between 65-89 years, mean age 75.6 years) participated to this study. The subjects were all healthy volunteers, non-smokers, non-drinkers and free of clinically apparent cardiovascular diseases. All subjects had normal renal and liver function. No subjects showed clinical or laboratory signs of inflammation or diabetes. All subjects had normal thyroid function tests and none of the women were currently taking estrogen replacement therapy for menopause. They were free from any medication and no oral antioxidant supplementation was used. All participants gave informed, written consent and the Ethics Committee of the Sherbrooke Geriatric University Institute approved the study protocol.

Blood collection

After an overnight fasting, 80 ml of blood were collected in heparin-containing vacuum tubes and the serum was separated by low speed centrifugation (1000g) and then stored at -80°C until used for PON1 purification. HDL and LDL were isolated immediately after blood collection.

LDL and HDL preparation

Blood was collected in heparin to avoid PON1 inactivation by EDTA. All precautions were taken to prevent lipoprotein modifications during its purification. HDL and LDL obtained from young and elderly donors were isolated by sequential ultracentrifugation (13). In brief, LDL ($1.019 < d < 1.063$) and HDL ($1.063 < d < 1.19$) were separated by 2 hours of ultracentrifugation at 15°C at 100,000 rpm in a TLA 100.4 rotor. LDL separated from elderly subjects and HDL separated from young and elderly subjects (Y-HDL and E-HDL) were dialyzed extensively overnight at 4°C in spectrapor membrane tubing (spectrum Medical Industries, exclusion limit, 12 000 to 14 000) against 2 changes of sodium phosphate buffer 10^{-2} M (pH 7.0), with argon bubbling at a rate of 20 ml/min through the dialysis solution (4 L). Concentrations of HDL and LDL solutions are given in terms of total protein concentrations. Proteins were measured by the Pierce method according to recommended procedure (Pierce, Rockford, IL, USA).

Analysis of paraoxonase activity

PON1 activity was determined using paraoxon as a substrate and measured by increases in the absorbance at 412 nm due to the formation of 4-nitrophenol, as already described (14). Briefly, the activity was measured, at 25°C , by adding 50 μl of serum to 1 ml Tris/HCl buffer (100 mM, pH 8.0) containing 2 mM CaCl_2 and 5.5 mM of paraoxon.

The rate of generation of 4-nitrophenol was determined at 412 nm. Enzymatic activity was calculated using the molar extinction coefficient $17\,100\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. One unit of p.ase activity is defined as 1 nM of 4-nitrophenol formed per minute under the above assay conditions.

Arylesterase assay

Arylesterase activity was measured spectrophotometrically. The assay contained 1 mM phenylacetate in 20 mM Tris/HCl, pH 8. The reaction was started by the addition of serum and the increase in absorbance was recorded at 270 nm, as already described (14). Blanks were included to correct for the spontaneous hydrolysis of phenylacetate. Enzyme activity was calculated using the molar extinction coefficient of $1310\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. 1 unit (U) is defined as 1 μmol phenylacetate hydrolysed per minute.

Paraoxonase phenotype distribution

The phenotypic distribution of PON1 was determined by the dual substrate method as previously described (14). The ratio of the hydrolysis of paraoxon in the presence of 1 M NaCl (salt-stimulated paraoxonase) to the hydrolysis of phenylacetate was used to assign individuals to one of three possible phenotypes (15). Cut-off values between phenotypes were as follows: ratio < 3.0 for QQ, ratio between 3.0 and 7.0 for QR and ratio > 7.0 for RR genotype.

Paraoxonase purification

Two hundred ml were used for each separation corresponding to pool of plasma obtained from 20 subjects in each age group. The two age groups were selected to have the same PON1's phenotype distribution (77%, 7% and 14% for genotype QQ, QR and RR respectively). PON1 was purified using blue agarose and DEAE chromatography as

described (16) with some modifications. Briefly, plasma was mixed with blue agarose (Cibacron Blue 3GA, Sigma Chemical Co.) in a solution containing 3 M NaCl, 50 mM Tris/HCl buffer (pH 8.0) 1 mM CaCl_2 and 5 μM EDTA. PON1 was eluted with 0.1% deoxycholate. The blue agarose-eluted PON1 was further purified by DEAE Biogel anion exchange chromatography (Sigma Chemical Co.) using a NaCl linear gradient. The purity of the enzyme was verified by SDS-PAGE. The enzyme preparations were stored at 4 °C.

LDL oxidation by γ -radiolysis

γ -irradiation were carried out with a ^{60}Co Gamma Cell 220 (Atomic Energy of Canada, Mississauga, ON, Canada) as previously described (17). The use of water γ -radiolysis allowed an accurate estimation of the nature and quantity of free radicals able to react with the HDL, unlike the commonly used techniques including the incubation of cells with transition metal ions. The dose rate was 0.13 Gy/sec as determined by Fricke and Morse dosimetry (18). Total radiation doses for LDL oxidation were varied from 0 to 200 Gy. Briefly, LDL were irradiated in oxygenated aqueous solution containing 10^{-2} M sodium phosphate buffer at pH 7, in the presence or absence of HDL. The effect of $\cdot\text{OH}/\text{O}_2\cdot^-$ on PON1 activities were studied at radiation doses between 0 and 1 500 Gy

In our experimental system, irradiation of aqueous solutions with ionizing radiation (γ rays of ^{60}Co in our case) leads to the formation of three major initial free radicals: hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$), hydrated electrons (e^-_{aq}), and hydrogen atoms ($\text{H}\cdot$) (19). In the presence of oxygen, e^-_{aq} is transformed quantitatively to superoxide radical anions ($\text{O}_2\cdot^-$) and perhydroxyl radicals ($\text{HO}_2\cdot$), respectively. $\text{HO}_2\cdot$ is the acid form of $\text{O}_2\cdot^-$ (pKa 5.7) (20). Thus, hydroxyl and superoxide free radicals were simultaneously produced with a

radiolytic yield (number of $\bullet\text{OH}$ and $\text{O}_2^{\bullet-}$ free radicals produced per unit of energy absorbed) of $2.8 \times 10^{-7} \text{ mol.J}^{-1}$ and $3.1 \times 10^{-7} \text{ mol.J}^{-1}$ respectively.

Measurement of LDL and/or HDL oxidation

Oxidation induced by the radiolysis of water was monitored as follows.

Conjugated diene formation: was evaluated by measurement of the differential absorbency at 234 nm (21). Lipid hydroperoxide formation: Lipid hydroperoxide formation was detected according to the method of el-Saadani et al. (22). The principle of this method is based on the oxidative capacity of lipid peroxides to convert iodide to iodine, which can be measured spectrophotometrically at 365 nm. The amount of lipid peroxide can be calculated with an extinction coefficient $\epsilon_{365 \text{ nm}}$: $2.46 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Malondialdehyde (MDA) formation: (MDA) was assayed by high-performance liquid chromatography (HPLC) as described by Agarwal and Chase (23). Briefly, samples were treated with the antioxidant (BHT) and heat derivatized at 100 °C for 1 h with thiobarbituric acid at an acid pH. Samples were extracted with n-butanol and 10 μl volumes of the extract were injected. The HPLC column was a HP hypersil 5 μ ODS 100 x 4.6 mm with a 5 μ ODS guard column and the mobile phase contained a methanol-buffer (40: 60, v/v). Fluorescence detection was carried out at an excitation wavelength of 515 nm and an emission wavelength of 553 nm.

Measurement of the antioxidant activity of HDL as a function of aging

To evaluate the HDL antioxidant effect towards LDL oxidation as a function of the age group, LDL (100 $\mu\text{g/ml}$) were oxidized alone, or in the presence of increasing concentrations of HDL (0 – 600 $\mu\text{g/ml}$) obtained from young (Y-HDL) or elderly (E-HDL) subjects. The antioxidant effect of HDL was then evaluated as follows: CD, LP

and MDA obtained in separately oxidized HDL were subtracted from the value obtained in the presence of LDL (HDL+LDL), which corresponds to LDL oxidation in the presence of HDL as described earlier (7,24).

Measurement of the antioxidant activity of PON1 as a function of aging

Similar experiments were carried out to compare the antioxidant effect of PON1 purified from young (Y-PON1) and elderly subjects (E-PON1). Briefly, LDL (100 µg/ml) were oxidized alone or in the presence of Y-PON1 or E-PON1 at concentration 27 and 80 µg protein/ml and CD, LP and MDA were used as lipid oxidation markers.

Determination of the effect of $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2\cdot$ free radical on the PON1 activities

Purified PON1 (80 µg/ml) was submitted to oxygen free radicals produced water γ -radiolysis (0 – 1 500 Gy). The enzymatic as well as the antioxidant activities of PON1 were evaluated as described above.

Measurement of the PON1 free sulfhydryl group

Free sulfhydryl (-SH) groups contained in native and irradiated PON1 were measured using the 2,2-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB) method as described by Hu et al (25).

SDS-PAGE electrophoresis

Native and irradiated PON1 were analyzed by SDS/PAGE as described by Laemmli (26) on 10 % SDS-PAGE gels (non-reducing conditions; Mini Gel II from BioRad, Hercules, CA). Each lane was loaded with 20 µg protein. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue.

Statistical analysis

Values are expressed as the mean \pm SEM. Mean values were compared using unpaired t-test and ANOVA. A P-value less than 0.05 was considered significant. Statistical analyses were performed using Prism 2.0 version software.

Results:

Effect of age on the antioxidant activity of HDL

Initial experiments were carried out in order to determine the antioxidant effect of HDL as a function of age. Y-HDL (200 µg/ml) and E-HDL (200 µg/ml) were incubated with LDL (100 µg/ml) from the same donors (elderly subjects). Oxidation was induced by $O_2^{\bullet-}/^{\bullet}OH$ oxygen free radicals produced by gamma radiolysis and then LDL lipid peroxidation (LDL alone or mixed to HDL) was followed by measuring CD, LP and MDA formation. As shown in Figure 1A, Y-HDL exhibited the highest antioxidant activity toward LDL oxidation which was two times higher than that with E-HDL, as assessed by CD formation (O. D. = 0.48 ± 0.037 vs. 0.94 ± 0.073 ; respectively). These results were confirmed by measurement of LP (Fig. 1 B) and MDA formation (Fig. 1C) [$(0.394 \pm 0.0169$ vs. 0.784 ± 0.0106 µmol/mg of protein) and $(41.04 \pm 1.579$ versus 61.28 ± 2.039 nmol/mg); respectively].

The antioxidant activity of HDL as a function of age of donors was evaluated at different (HDL/LDL) ratios. LDL were oxidized alone as described earlier, or in the presence of increased Y-HDL and E-HDL concentrations (200, 400 and 600 µg/ml). It is noteworthy that the (HDL/LDL) ratios used were within the physiological ranges (2 to 6 mol/mol). Figure 2 shows the protection of HDL towards LDL oxidation at different HDL/LDL ratios and as a function of the age of donors. Values are expressed as a percentage of the reduction in LDL peroxidation when oxidized in the presence of HDL and with comparison with LDL oxidized alone. Following oxidation at a fixed radiation dose of 200 Gy, the antioxidant activity of Y-HDL was significantly higher for all HDL/LDL ratios studied than with E-HDL. Interestingly Y-HDL showed increased

protection with HDL concentration, reaching a maximum of 97.11% protection for HDL concentration 600 μg . However, there was no significant differences in the E-HDL antioxidant activity at E-HDL protein concentration of 400 and 600 $\mu\text{g/ml}$, 68.17 and 67.53 %, respectively.

Effect of age on the protective properties of PON1 towards LDL-oxidation

It was already demonstrated that the antioxidant activity of HDL is principally related to PON1 activities. Thus, to elucidate the mechanism responsible for the reduction of HDL antioxidant activity with age, we were interested in investigating the effect of aging on the PON1 antioxidant activity. PON1 was purified from plasma of young and elderly healthy subjects. The two age-groups present the same PON1 phenotypic distribution (77%, 7% and 14% for genotype QQ, QR and RR respectively). For the same purified PON1 protein concentration, E-PON1 presents a lower p.ase activity (303.05 U/mg) compared to Y-PON1 (485.61 U/mg), that is in accordance with our previous results showing an age-related decrease in the PON1 p.ase activity (9,12). To address the antioxidant activity of PON1, the same units (expressed as the number of units of p.ase activity per mg protein) of purified Y-PON1 and E-PON1 were added to LDL (100 $\mu\text{g/ml}$) and submitted to $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2\cdot^-$ free radical action. This give a more concentrated protein solution for E-PON1 than Y-PON1, which caused only a minor and non-significant difference in the antioxidant activity of Y-PON1 and E-PON1 (data not shown). For subsequent experiments, PON1 was expressed and used at the same protein concentration for both age groups.

As shown in Figure 3A, PON1 showed a significant protection against LDL peroxidation as measured by LP formation. The antioxidant effect of PON1 was

concentration dependent and was higher at 80 $\mu\text{g/ml}$. Interestingly, at the latter concentration (80 $\mu\text{g/ml}$), PON1 was more efficient in protecting LDL against oxidation than vitamin E at a concentration 50 μM (Y-PON1 showed a 90% reduction in LP formation vs. 26.82 for vitamin E, $p < 0.05$).

However, when regarded as a function of aging, E-PON1 showed a lower antioxidant activity than Y-PON1 for the same concentration (Fig. 3A). E-PON1 (27 $\mu\text{g/ml}$) was not so efficient in protecting LDL against oxidation while Y-PON1 for the same concentration showed 20.97 % protection as measured by LP formation ($p < 0.03$). This effect may be caused by a defect in the PON1 or may provide evidence for an enzymatic mechanism of protection, requiring the presence of the enzyme at a sufficient concentration to catalyze the reaction efficiently. Incubation of LDL with Y-PON1 at a concentration of 80 $\mu\text{g/ml}$ and under oxidative stress conditions showed a 84.87% ($p < 0.001$) decrease in CD formation in comparison to 48.78 % for E-PON1 ($p < 0.001$) (Fig. 3B).

Effect of direct action of $\cdot\text{OH}/\text{O}_2\cdot$ on the antioxidant activity of the purified PON1

Aging is characterized by the development of oxidative stress conditions. Thus, a reduction in the antioxidant activity of PON1 in the elderly might be explained as resulting from oxidative damage induced by reactive oxygen species. In order to examine the effect of oxidative stress on the properties of PON1, we next subjected purified Y-PON1 (80 $\mu\text{g/ml}$) to oxygen free radicals produced by γ -radiolysis (at radiation doses between 0 and 1 500 Gy). As shown in Figure 4A, exposure of PON1 to $\cdot\text{OH}/\text{O}_2\cdot$ produced by γ -radiolysis at (500 Gy) induces a modest decrease in p.ase activity (12%), while at 1 000 and 1 500 Gy the inactivation PON1 towards p.ase activity was

significantly decreased [(35% ($P < 0.01$) and 64% ($P < 0.001$) respectively] (Fig. 4A). Native and irradiated PON1 were analyzed by SDS-PAGE and showed no protein fragmentation even at high radiation doses (Fig. 4 B).

In an attempt to gain more insight into the effect of oxygen free radicals ($\cdot\text{OH}/\text{O}_2\cdot$) on PON1 antioxidant activity, native and irradiated PON1 (500, 1 000 and 1 500 Gy) were evaluated for their antioxidant activity towards LDL peroxidation. Kinetics monitoring of CD formation showed a significant decrease in the antioxidant activity of the irradiated PON1. Oxidation of LDL in presence of native PON1 induced a reduction in CD formation by about 77% (Fig. 5). While, PON1 irradiated at 500 and 1 000 Gy reduced CD by only 64% ($p < 0.01$) and 46%, respectively ($p < 0.001$). Finally, no significant protection was offered by PON1 exposed to a radiation dose of 1 500 Gy.

Role of PON's free sulfhydryl group in the protection against LDL oxidation

We next investigated the potential effect of irradiation on the paraoxonase sulfhydryl group. Several studies have shown that the cysteine-284 is responsible for the antioxidant property of PON1. The measure of total thiol groups as determined by the DTNB method showed that exposure of PON1 to γ - radiolysis induce a decrease in SH group composition (Fig. 6). Therefore, our results show a close association between the antioxidant activity of PON1 and the number of free SH groups contained within PON1, which suggests that the loss of the antioxidant activity of the PON1 might be due to an alteration of the number of free thiol groups within PON1. Indeed, as illustrated in Fig. 7A, PON1 treated with 10 μM NEM, a SH-reagent, leads to a complete loss of its antioxidant activity.

In light of these results and to clarify the mechanism at the origin of the reduction of the antioxidant activity of PON1 with aging, we were interested in comparing the amount of PON1's free sulfhydryl groups between young and elderly (Fig. 7B). Quantitative titration of the purified Y-PON1 confirmed the presence of a unique free sulfhydryl group. in contrast, our results show a significant decrease in the number of PON1's sulfhydryl groups in the elderly ($P < 0.0092$) (Fig. 7B).

Discussion

The development of extensive atherosclerosis of major arteries of the heart, brain and lower extremities is a frequent problem in elderly individuals and is responsible for the majority of the cardiovascular morbidity and mortality in this population. The dramatic increase of atherosclerosis and its clinical manifestations, with age, could be due to the increased susceptibility of LDL and HDL to oxidation as shown in our previous studies (9,27,28). Moreover, a decrease in the specific anti-atherogenic activity of HDL in the elderly might also contribute. It has been reported that in vitro HDL antioxidant activity was reduced in diabetic subjects when compared to healthy subjects with correction for age and in postmenopausal women (8,24,29,30). In animal models, an impaired HDL antioxidant defense was observed in dyslipidemic obese mice (31). For all these studies, PON1 was suspected to be implicated in the alteration of the HDL anti-atherogenic function. In human population studies, low PON1 enzymatic activity is associated with atherosclerosis. Indeed, PON1 activity is reduced in pathologies associated with atherosclerosis e.g. CVD, diabetes, familial hypercholesterolemia and chronic renal failure (32-35). Two different studies from our laboratory showed a significant decrease in the PON1 p.ase activity with aging. (9,12) The reduction of the PON1 p.ase activity in the elderly was not explained either by the decrease of the PON1 concentration or by its phenotypic distribution (9). In light of these results, this work was aimed to investigate changes in the antioxidant property of HDL with aging and to elucidate the implication of PON1 in this process.

Our results show a significant reduction in the E-HDL antioxidant activity in comparison to Y-HDL. The decrease in the HDL antioxidant activity with age was

demonstrated at different HDL/LDL ratios (2, 4 and 6). Because in our experiments HDL and LDL were tested at fixed concentrations, our results are independent of the lipoprotein plasma concentration as already demonstrated (24,36). The HDL antioxidant activity was concentration dependent that is in accordance with data obtained by Mackness et al. (37). Interestingly, the increase of the HDL antioxidant effect as a function of its concentration was verified only for Y-HDL and was significantly higher than E-HDL for different HDL/LDL ratios studied.

Many studies have shown that the antioxidant activity of HDL is due principally to the PON1. Indeed, HDL are the poorest lipoproteins in antioxidants (α -tocopherol, β -carotene, lycopene) e.g. HDL contains less than one molecule of α -tocopherol per each HDL particle while VLDL and LDL contain 12 and 45 molecules of α -tocopherol per particle, respectively (38,39). A clear demonstration for the implication of PON1 in the HDL antioxidant activity has been made by Shih et al. using PON1 knockout mice (40) PON1 knockout mice were more susceptible to develop atherosclerosis than wild type and their HDL was less able to protect LDL against oxidation (40). Given that the plasmatic concentration of PON1 does not change significantly between young and elderly (9), a decline in the antioxidant activity of HDL with age could be attributed to a change in the specific antioxidant activity of PON1.

In an attempt to explain the decrease of the antioxidant activity, Y-PON1 and E-PON1 were evaluated for their capacity to protect LDL against oxidation. Independently of the age of donors, purified PON1, used at physiological concentration (80 μ g/ml), was more effective in protecting LDL against oxidation than vitamin E (50 μ M α -tocopherol). These results confirm that PON1 could be a powerful antioxidant for inhibiting LDL

oxidation as already proposed by Mackness et al. (37) for HDL, although the antioxidant activity of PON1 was influenced by the age of donors. Thus, these results suggest that the decrease in the HDL antioxidant activity with age could be explained by a diminution in the PON1 specific antioxidant effect.

During the preparation of this paper, a study published by Teiber et al. indicates that purified PON1 was unable to protect LDL against oxidation initiated by copper ions (41). The authors of this study suggest that the antioxidant activity of PON1 purified by the protocol of Gan et al., might be due to tregitol, which is contained in the purification solutions or to other proteins present as minor contaminants (41). In our study, Y-PON1 as well as E-PON1 were purified according to the protocol developed by Gan et al (16). and both showed a significant antioxidant effect towards LDL oxidation. Also, our results show that Y-PON1 presents a higher antioxidant effect when compared to E-PON1. Given that tergitol was used at the same concentration during the purification procedures, this excludes the hypothesis that tergitol can interfere with the antioxidant effect of PON1 in our oxidation system. Moreover, we have demonstrated that PON1 inactivated by irradiation presents a lower antioxidant activity when compared to native PON1 at the same tergitol concentration. Thus, our results confirm that the antioxidant effect observed in our oxidation system is due principally to the PON1 and that the decrease in HDL antioxidant activity is due to a reduction in the PON1 antioxidant effect.

Sorenson et al. had demonstrated that purified human and rabbit PON1 present a single free sulfhydryl group in the native state and proposed that cysteine 284 as the active site of the PON1 for its antioxidant effect (5) . The data presented on the effect of blocking the free sulfhydryl group with NEM agree with studies using p-

hydroxymercuribenzoate or PON1 mutants, in which the cysteine residue had been replaced with either serine or alanine showed that PON1 was unable to inhibit LDL oxidation (3). Exposition of PON1 to oxygen free radical induced a significant reduction in the number of free SH group on PON1, which is accompanied by a significant diminution of the PON1 antioxidant activity. The close association between the number of SH group on PON1 and its residual antioxidant activity is a clear indication for the implication of the Cys-284, in its reduced form, in the antioxidant effect of PON1. Therefore, these results confirm that Cys-284 is a major amino acid in the active center of PON1 and suggest that the inactivation of PON1 towards its antioxidant activity in the elderly could be due to an alteration of the Cys-284 as a consequence of the development of oxidative stress with aging. Indeed, comparison between Y-PON1 and E-PON1, shows a significant reduction in the number of sulfhydryl groups on E-PON1, which could explain the reduction in the PON1 antioxidant effect with aging, and therefore, the antioxidant activity of HDL in the elderly. The decrease of the PON1 activity in smokers has been demonstrated as a consequence of the elevated stress conditions as well as to a modification at the enzyme's free thiols (42). We advance that it might also be the case, but at small extent, during the aging process.

In summary, our results demonstrated a decreased PON1 protection effect towards LDL peroxidation with aging. We also show for the first time that decreased activity with age is due to a diminished SH content in PON1. Further studies are needed to investigate how to modulate the SH content on PON1.

Acknowledgements:

This work was supported by a grant from the Canadian Institute of Health Research and grant-in-aid from the Centre de Recherche sur le Vieillissement. This support is gratefully acknowledged. A. Khalil is Junior 2 fellow of FRSQ.

References

- [1] Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler.* 2001;**21**:473-80.
- [2] Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J. Clin. Invest.* 1995;**96**:2882-91.
- [3] Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Eroglu J, Hsu C, Dunlop C, La Du B. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998;**18**:1617-24.
- [4] Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Eroglu J, Sorenson R, Bisgaier L, Newton RS, La Du B. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 1999;**26**: 892-904.
- [5] Sorenson, RC, Primo-Parmo SL, Kuo CL, Adkins S, Lockridge O, La Du BN,. Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1995;**92**:7187-91.
- [6] Jaouad L, Milochévitch C, Khalil A. PON1 paraoxonase activity is reduced during HDL oxidation and is an indicator of HDL antioxidant capacity. *Free Radic. Res.* 2003;**37**:77-83.
- [7] Sanguinetti SM, Brites FD, Fasulo V, Verona J, Elbert A, Wikinski RL, Schreier LE. HDL oxidability and its protective effect against LDL oxidation in Type 2 diabetic patients. *Diabetes Nutr. Metab.* 2001;**14**: 27-36.
- [8] Gowri MS, Van der Westhuyzen DR, Bridges SR, Anderson JW. Decreased protection by HDL from poorly controlled type 2 diabetic subjects against LDL oxidation may be due to the abnormal composition of HDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999;**19**:2226-33.
- [9] Seres I, Paragh G, Deschene E, Fulop Jr T, Khalil A. Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. *Exp. Gerontol.* 2004;**39**:

59-66.

- [10] Gussekloo J, Schaap MC, Frolich M, Blauw GJ, Westendorp RG. Creactive protein is a strong but nonspecific risk factor of fatal stroke in elderly persons. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000;**20**:1047-51.
- [11] Ershler WB, Keller ET. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu. Rev. Med.* 2000;**51**:245-70.
- [12] Milochevitch C, Khalil A. Study of the paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase activities with aging. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty. Acids* 2001;**65**:241-6.
- [13] Sattler W, Mohr D, Stocker R. Rapid isolation of lipoproteins and assessment of their peroxidation by high-performance liquid chromatography postcolumn chemiluminescence. *Methods Enzymol.* 1994;**233**:469-89.
- [14] Eckerson HW, Romson J, Wyte C, La Du BN. The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts. *Am. J. Hum. Genet.* 1983;**35**:214-27.
- [15] Smolen A, Eckerson HW, Gan KN, Hailat N, La Du BN. Characteristics of the genetically determined allozymic forms of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug. Metab. Dispos.* 1991;**19**:107-12.
- [16] Gan, KN, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab. Dispos.* 1991;**19**:100-6.
- [17] Khalil A, Fortin JP, LeHoux JG, Fulop Jr T. Age-related decrease of dehydroepiandrosterone concentrations in low density lipoproteins and its role in the susceptibility of low density lipoproteins to lipid peroxidation. *J. Lipid Res.* 2000;**41**:1552-61.
- [18] Fricke H. The chemical action of Röntgen rays on dilute ferrosulfate solutions as measure of dose . *Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med.* 1927;**18**:429-432.

- [19] Spink JWT, Wood RJ. An introduction to Radiation Chemistry. 1990, New York, Wiley-Interscience.
- [20] Bielski BHJ. Reevaluation of the spectral and kinetic of hydroperoxide and superoxide anion free radicals . *Photochem. Photobiol.* 1978;**28**:645-649.
- [21] Bonnefont-Rousselot D, Motta C, Khalil A, Sola R, La Ville AE, Delattre J, Gardes-Albert M. Physicochemical changes in human high-density lipoproteins (HDL) oxidized by gamma radiolysis-generated oxyradicals. Effect on their cholesterol effluxing capacity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995;**1255**: 23-30.
- [22] el-Saadani M, Esterbauer H, el-Sayed M, Goher M, Nassar AY, Jurgens GA. spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. *J. Lipid Res.* 1989;**30**:627-30.
- [23] Agarwal R, Chase SD. Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002;**775**:121-6.
- [24] Zago V, Sanguinetti S, Brites F, Berg G, Verona J, Basilio F, Wikinski R, Schreier L. Impaired high-density lipoprotein antioxidant activity in healthy postmenopausal women. *Atherosclerosis* 2004;**177**:203-10.
- [25] Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol.* 1994;**233**:380-5.
- [26] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970;**182**:499-520.
- [27] Khalil A, Wagner JR, Lacombe G, Dangoisse V, Fulop Jr T. Increased susceptibility of low-density lipoprotein (LDL) to oxidation by gamma-radiolysis with age. *FEBS Lett.* 1996;**392**:45-8.
- [28] Khalil A, Jay-Gerin JP, Fulop Jr T. Age-related increased susceptibility of high-density lipoproteins (HDL) to in vitro oxidation induced by gamma-radiolysis of water. *FEBS Lett.* 1998;**435**:153-8.
- [29] Ferretti G, Bacchetti T, Busni D, Rabini RA, Curatola G. Protective effect of paraoxonase activity in high-density lipoproteins against erythrocyte membranes

peroxidation: a comparison between healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004;**89**:2957-62.

- [30] Valabhji J, McColl AJ, Schachter M, Dhanjil S, Richmond W, Elkeles RS. High-density lipoprotein composition and paraoxonase activity in Type I diabetes. *Clin. Sci.* 2001;**101**:659-70.
- [31] Mertens A, Verhamme P, Bielicki JK, Phillips MC, Quarek R, Verreth W, Stengel D, Ninio E, Navab M, Mackness B, Mackness M, Holvoet P. Increased low-density lipoprotein oxidation and impaired high-density lipoprotein antioxidant defense are associated with increased macrophage homing and atherosclerosis in dyslipidemic obese mice: LCAT gene transfer decreases atherosclerosis. *Circulation* 2003;**107**:1640-6.
- [32] Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Boulton AJ, Durrington PN. Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995;**15**:1812-8.
- [33] Tomas M, Senti M, Garcia-Faria F, Vila J, Torrents A, Covas M, Marrugat J. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000;**20**:2113-9.
- [34] McElveen J, Mackness MI, Colley C, Peard T, Warner S, Walker CH. Distribution of paraoxon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction. *Clin. Chem.* 1986;**32**:671-3.
- [35] Ikeda Y, Suehiro T, Inoue M, Nakauchi Y, Morita T, Arai K, Ito H, Kumon Y, Hashimoto K. Serum paraoxonase activity and its relationship to diabetic complications in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1998;**47**:598-602.
- [36] Eisenberg S. High density lipoprotein metabolism. *J. Lipid Res.* 1984;**25**:1017-58.
- [37] Mackness MI, Abbott C, Arrol S, Durrington PN. The role of high-density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. *Biochem. J.* 1993;**294**: 829-34.
- [38] Romanchik JE, Morel DW, Harrison EH. Distributions of carotenoids and alpha-tocopherol among lipoproteins do not change when human plasma is incubated in

vitro. J. Nutr. 1995;**125**:2610-7.

- [39] Bonnefont-Rousselot D, Khalil A, Gardes-Albert M, Delattre J. Reciprocal protection of LDL and HDL oxidised by .OH free radicals in the presence of oxygen. FEBS Lett. 1997;**403**:70-4.
- [40] Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, Lusis AJ. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. Nature 1998;**394**:284-7.
- [41] Teiber JF, Draganov DI, La Du BN. Purified human serum PON1 does not protect LDL against oxidation in the in vitro assays initiated with copper or AAPH. J. Lipid. Res. 2004;**45**:2260-8.
- [42] Senti M, Aubo C, Tomas M. Differential effects of smoking on myocardial infarction risk according to the Gln/Arg 192 variants of the human paraoxonase gene. Metabolism 2000;**49**:557-9.

Fig. 1: Antioxidant effect of Y-HDL and E-HDL against LDL peroxidation as measured by the (A) conjugated diene (B) lipid peroxide and (C) malondealdehyde formation. LDL (100 μg protein/ml) were incubated with 200 μg protein/ml of Y-HDL or E-HDL and the mixtures were subjected to $\cdot\text{OH}/\text{O}_2^-$ free radicals produced by \square -radiolysis of water. See text for details. Each value is the mean \pm standard deviation of 4 different experiments. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Fig. 2: Antioxidant effect of HDL as a function of the age of donors (Y-HDL vs. E-HDL) and HDL concentrations (200, 400 and 600 μg protein/ml). Results are expressed as percentage reduction in lipid peroxide formation in LDL oxidized alone or in the presence of HDL. \bigcirc % of protection of LDL from oxidation upon incubation with Y-HDL. \bullet Percentage of protection of LDL from oxidation incubated with E-HDL. Values are expressed as mean \pm deviation of 4 independent experiments. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

Fig. 3: A) Lipid peroxide formation in LDL oxidized alone or in the presence of purified PON1. PON1 was purified from plasma of young (Y-PON1) and elderly healthy subjects (E-PON1) and used at two different concentrations (27 and 80 μg protein/ml). Protection by PON1 was compared to vitamin E (\square -tocopherol) at concentration 50 μM . LDL (100 μg protein/ml) oxidation was induced by $\cdot\text{OH}/\text{O}_2^-$ while lipid peroxidation was followed by the measurement of formation of conjugated diene (O.D. 234 nm). * $p < 0.01$ and ** $p < 0.03$ compared with LDL alone. # $p < 0.05$ compared with vitamin E.

B) Effect of aging on the antioxidant activity of PON1 towards LDL peroxidation as measured by the conjugated diene formation (O.D. 234 nm). Y-PON1 and E-PON1 were purified from young and elderly healthy subjects, respectively, and were used at fixed protein concentration (80 µg protein/ml). LDL were at concentration 100 µg protein/ml and oxidation was induced by 'OH/O₂' free radicals. Results are given as mean ± SD (n=4). ** p<0.01 *** p<0.001 (vs. native PON1).

Fig. 4: **A)** Effect of gamma radiation on PON1 paraoxonase activity expressed as a percent of the remaining p.ase activity. P.ase activity was measured in native and irradiated PON1 as described in materials and methods. PON1 was used at concentration 80 µg/ml and exposed to gamma radiation under oxygen-saturated conditions.

B) Electrophoretic patterns (SDS-PAGE, 10% acrylamide) of native PON1 (0 Gy) and PON1 exposed to increasing doses of gamma radiation (500, 1000 and 1500 Gy). M, molecular weight marker.

Fig. 5: Inhibition of the antioxidant activity of PON1 by $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ free radicals produced by gamma radiolysis of water. PON1 at concentration 80 μg protein/ml was submitted to increasing gamma radiation doses (0, 500, 1 000 and 1 500 Gy) under oxygen saturated conditions followed by the measure of the PON1 antioxidant effect towards LDL peroxidation. Lipid peroxidation was induced by exposition of LDL (100 μg proten/ml) alone or in presence of native or irradiated PON1 to $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ free radicals produced at radiation dose 200 Gy. LDL oxidation was evaluated by the measure of conjugated diene formation (O.D. 234 nm). Results are given as mean \pm SD (n=4). *p< 0.01 *** p<0.001 (vs. LDL oxidized alone).

Fig. 6: Effect of $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ free radicals on the number sulfhydryl group contained within PON1 as measured by the change of absorbance at 412 nm according to the DTNB method (see methods). PON1 at concentration 80 μg protein/ml was exposed to increasing gamma radiation doses (0, 500, 1 000 and 1 500 Gy). *p<0.01 *** p<0.001(v.s. native PON1).

Fig. 7: A) Effect of blocking sulfhydryl group with NEM on its protection against LDL oxidation. LDL and PON1 were used at concentration 100 and 80 μg protein/ml respectively. NEM was used at concentration 10 μM and LDL oxidation was induced by $\text{O}_2^{\cdot-}/\text{OH}$ free radicals.

B) Measure of the PON1 sulfhydryl group as a function of age. Y-PON1 and E-PON1 were purified from young and elderly healthy subjects. Sulfhydryl groups were measured by the DTNB method. Results are the mean \pm SD (n=3).

P=0.0092

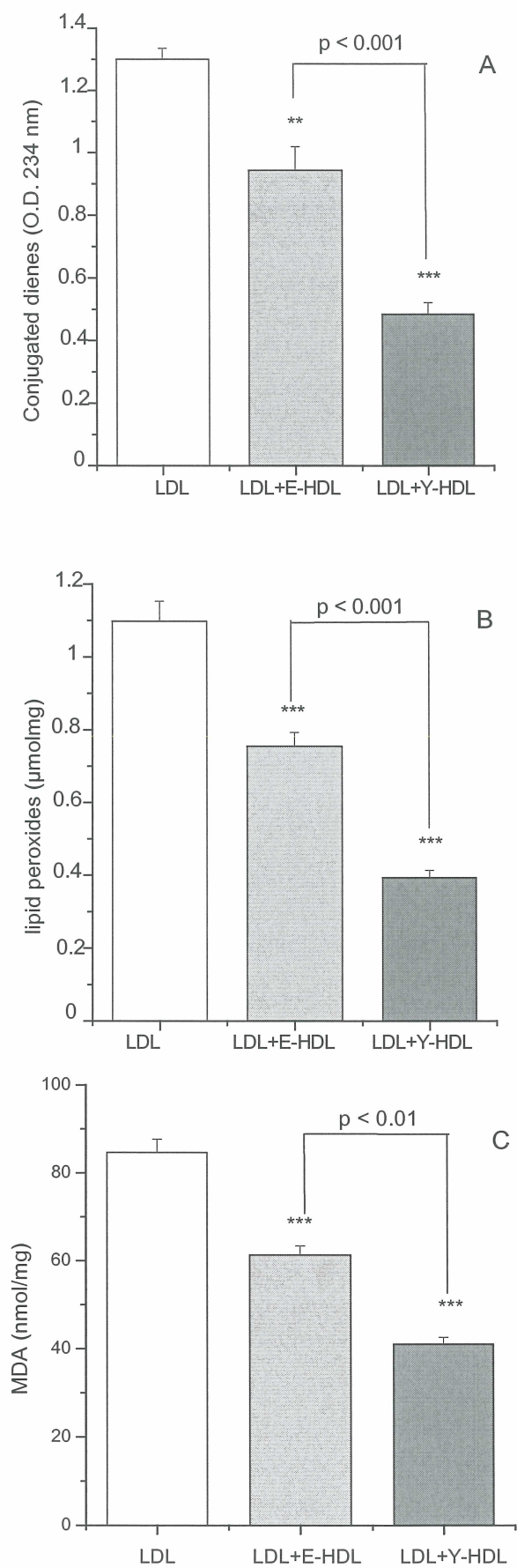
Fig. 1

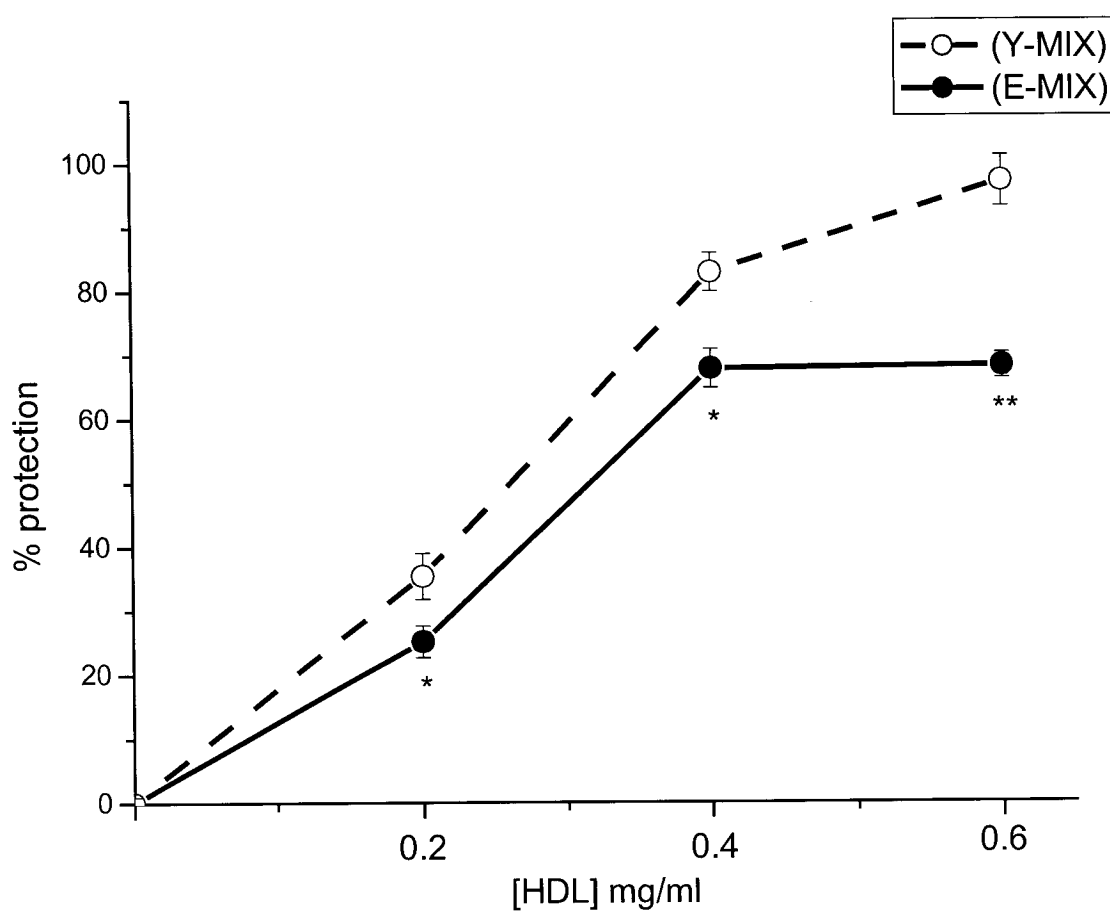
Fig. 2

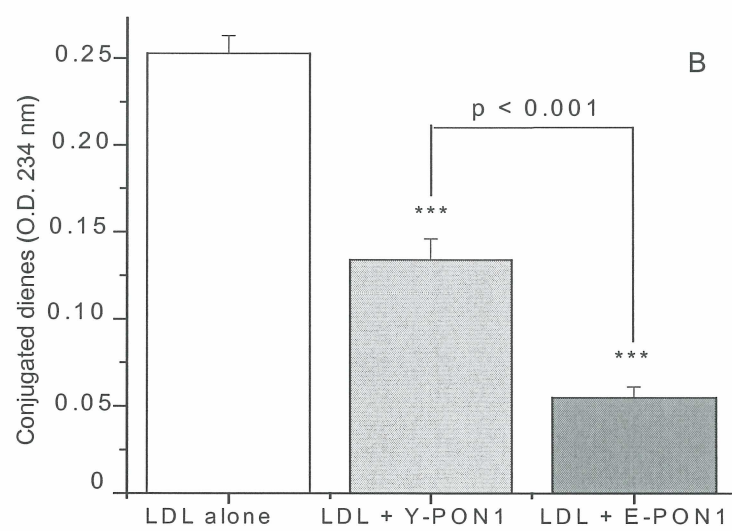
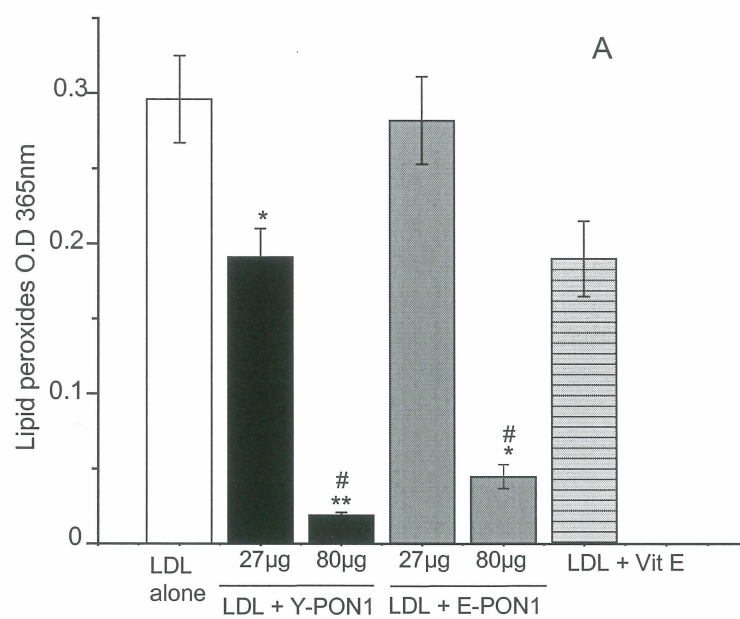
Fig. 3

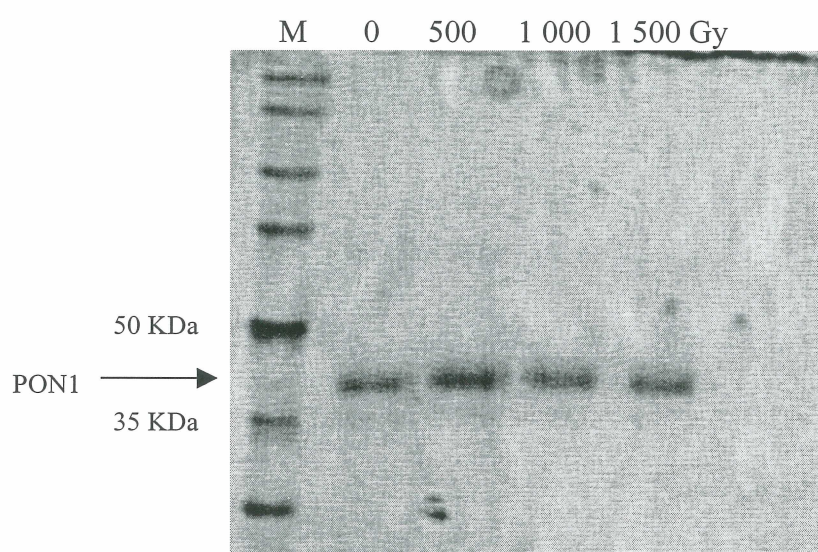
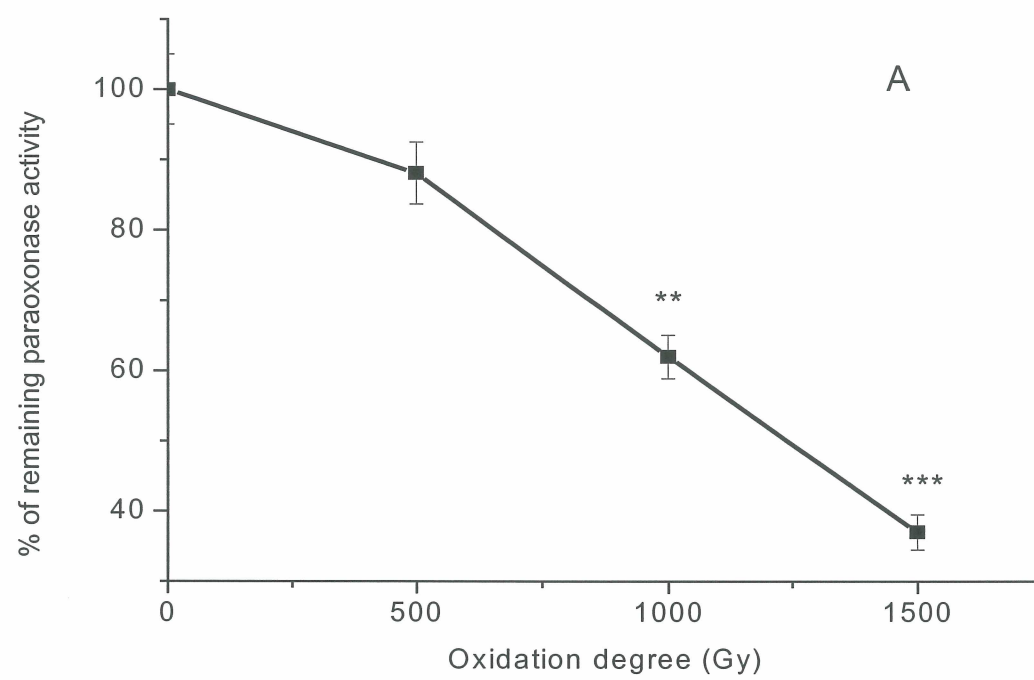
Fig. 4

Fig. 5

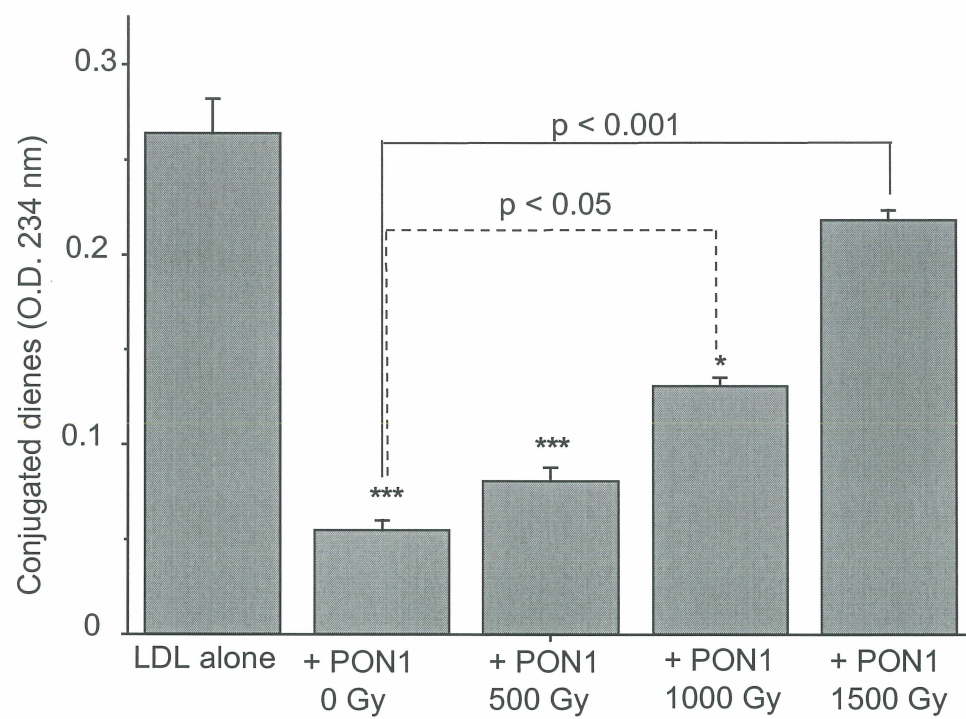


Fig. 6

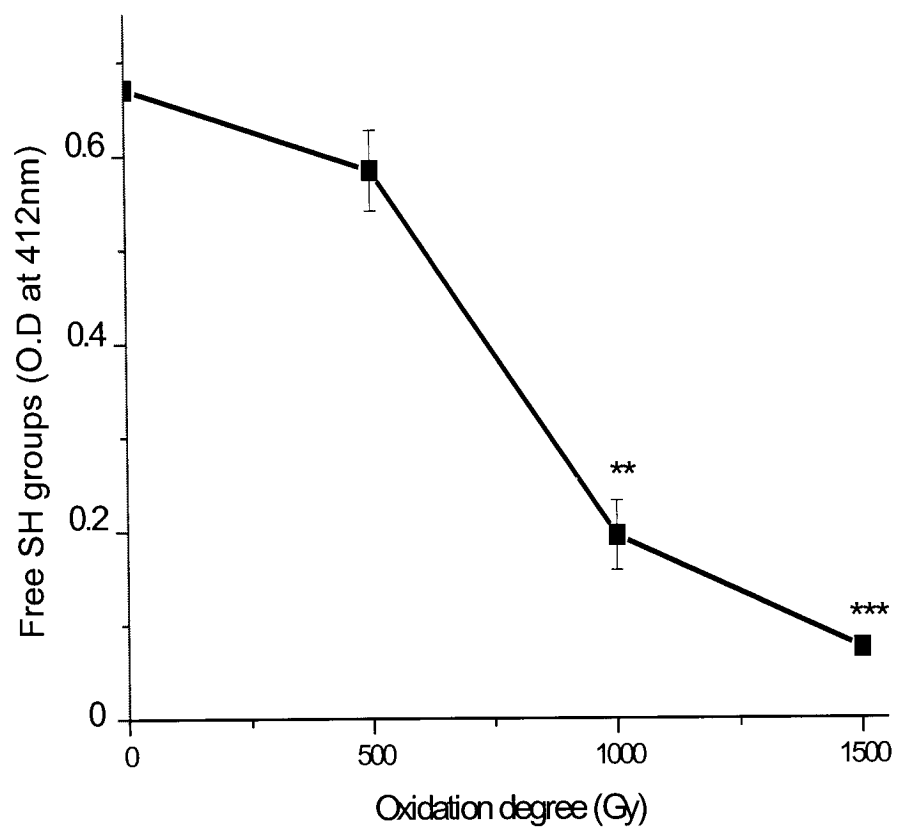
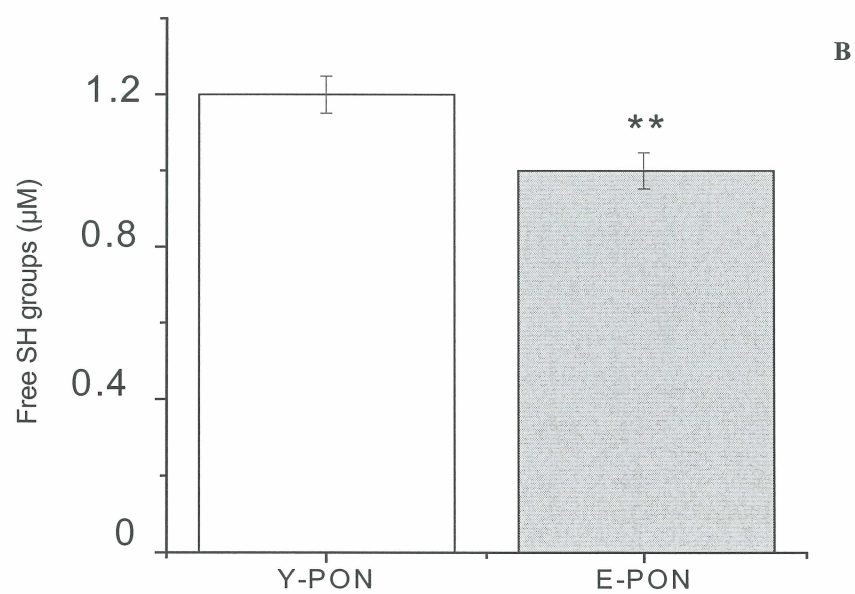
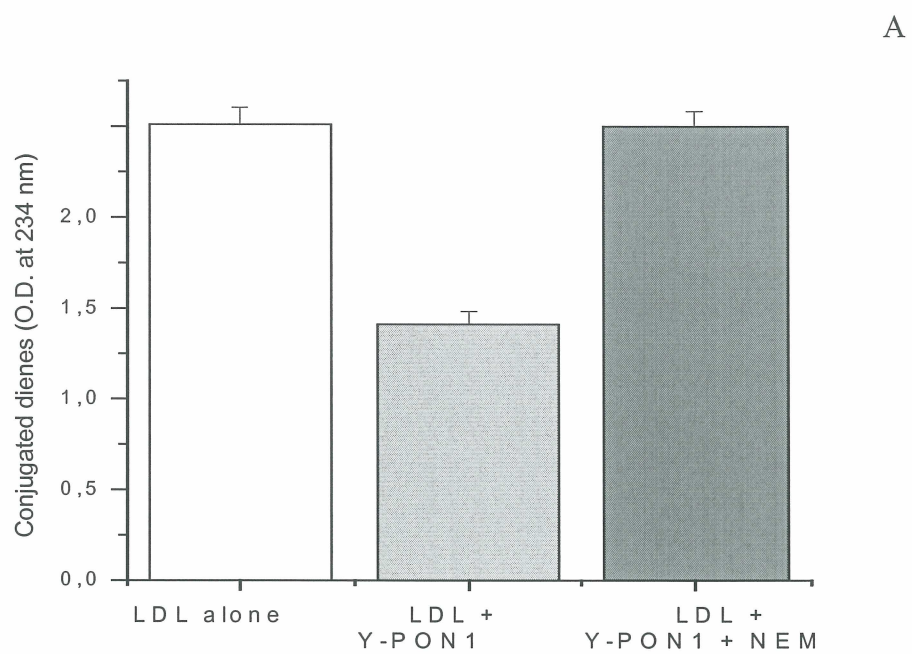


Fig. 7

** $p=0.0092$

3. DISCUSSION

Nous avons avancé l'hypothèse sur l'effet d'un stress oxydatif qui pourrait contribuer à l'augmentation de la susceptibilité des lipoprotéines à l'oxydation et donc à une diminution de l'activité des enzymes qui leurs sont associées en particulier les enzymes antioxydantes (PON1 et PAF-AH).

Nos résultats ont permis de démontrer que l'activité paraoxonase de la PON1 est un indicateur du potentiel antioxydant des HDL. De plus, nous avons montré que l'altération de l'activité antioxydante des HDL observée au cours du vieillissement est reliée à une diminution du nombre des groupements thiol de la PON1. Cette étude vient donc approfondir les connaissances sur l'activité antioxydante des HDL et de l'enzyme paraoxonase¹.

Dans les sections qui suivent, nous discuterons tout d'abord de l'effet de l'oxydation sur les propriétés antioxydantes des HDL, ensuite nous aborderons l'impact du vieillissement sur les propriétés antiathérogènes de ces lipoprotéines et de la PON1.

3.1 Effet de l'oxydation des HDL sur l'activité paraoxonase (premier article)

Plusieurs évidences suggèrent que l'effet antioxydant des HDL est principalement associé à l'enzyme PON1 (AVIRAM et al., 1998). En effet, la PON1 diminue l'oxydation des phospholipides et semble représenter un facteur protecteur important contre le stress oxydatif et ses conséquences délétères. Cependant, lors d'un stress oxydatif, l'oxydation probable des HDL in vivo favoriserait le processus athéromateux par la perte de leur capacité d'efflux du cholestérol cellulaire et aussi par l'altération de leurs propriétés à protéger les LDL de l'oxydation.

La PON1 purifiée permet de protéger les LDL de l'oxydation et aussi de bloquer les effets chimiotactiques des MMLDL (AHMED et al., 2003). D'autre part, il a été démontré que l'activité arylestérase de la PON1 purifiée diminue au cours de l'oxydation des LDL ainsi qu'en présence des ox-LDL (AVIRAM et al., 1999). Dans nos expériences, nous avons évalué l'effet de l'oxydation sur l'enzyme paraoxonase au sein de son «environnement naturel» au niveau des HDL.

Nous avons utilisé trois systèmes d'oxydation soit l'oxydation avec les ions du cuivre, l'oxydation avec les cellules THP1 et avec les radicaux libres produits par radiolyse gamma de l'eau. L'évaluation des produits de l'oxydation dans les HDL a été effectuée selon la méthode de Esterbauer (ESTERBAUER et al., 1989) qui permet de suivre la cinétique de l'oxydation des lipoprotéines en mesurant la formation continue des diènes conjugués (DC) en spectrophotométrie à 234 nm. Plusieurs études cliniques et biochimiques ont utilisé cette méthode qui permet d'évaluer la phase de latence, caractérisée par la consommation des antioxydants endogènes et donc de mesurer la susceptibilité des lipoprotéines à l'oxydation (WATSON et al., 1995a) (GOWRI et al., 1999). Dans nos expériences, nous avons aussi procédé à l'évaluation des hydroperoxydes. En effet, au cours de la phase de propagation, la mesure de la formation des hydroperoxydes est l'une des méthodes largement utilisée reposant sur le principe que les peroxydes lipidiques oxydent l'iodide I^- en iode I_2 selon la réaction:

$ROOH + 2I^- + 2H^+ \rightarrow I_2 + ROH + H_2O$. En présence d'un excès d'iodide (I^-), il y a formation de l'ion tri-iodide (I_3^-) qui peut être mesuré par spectrophotométrie à 358 nm (HALLIWEL B, 1989).

L'oxydation des HDL par les ions du cuivre induit une augmentation drastique des hydroperoxydes accompagnée par une diminution de l'activité paraoxonase. Cette diminution pourrait être due à un changement de conformation suite au déplacement des ions calcium induit par les ions Cu^{2+} (AVIRAM ET al., 1998). L'utilisation des deux autres systèmes d'oxydation nous a permis de montrer que l'activité paraoxonase diminue aussi bien en présence qu'en absence des ions du cuivre (lors de l'oxydation par radiolyse gamma). L'inactivation de la PON1 ne serait donc pas seulement limitée au déplacement des ions Ca^{2+} mais aussi à d'autres mécanismes associés avec l'oxydation des HDL.

Puisque l'enrichissement des HDL en α -tocophérol préserve leur potentiel antioxydant (Figure 4A) et que la cinétique de l'oxydation des HDL ainsi que l'altération de l'activité paraoxonase dépend étroitement du système d'oxydation utilisé (Tableau 1), on peut conclure que les lipides oxydés formés durant l'oxydation des HDL participent à l'inactivation de la PON1. En effet, l'activité de la PON1 dépend fortement de sa stabilité, qui est favorisée par son association avec l'Apo AI dans un environnement riche en phospholipides (ABBOTT et al., 1995; AVIRAM et al., 1998). Ainsi, lors de l'oxydation, l'altération de l'un de ces composés abolie ce micro environnement et/ou les acides aminés du site actif de la PON1.

Nos résultats montrent une corrélation significative et positive entre l'activité paraoxonase et la capacité des HDL à protéger les LDL de l'oxydation ($r=0.95$, $p<0.04$) (Figure 4B et Tableau II). Puisque l'activité antioxydante des HDL dépend d'autres composés, particulièrement le PAF-AH la LCAT la CETP et l'Apo A1 (NAVAB et al., 2001). Ces résultats suggèrent une altération de tous ces composés et au même degré que

celui de la PON1 au cours de l'oxydation des HDL. On conclut donc que l'activité paraoxonase de la PON1 peut être considérée comme un indicateur du potentiel antioxydant des HDL.

3.2 Effet de l'âge sur les propriétés antioxydantes des HDL et de la PON1 (deuxième article)

Le développement de l'athérosclérose dans les artères du cœur, du cerveau et des membres inférieurs est un problème fréquent chez les personnes âgées. L'athérosclérose est responsable de la majorité des cas de mortalité et de morbidité de cette population. L'augmentation de l'athérosclérose et de ces manifestations cliniques avec l'âge serait le résultat de l'augmentation de la susceptibilité des LDL et des HDL à l'oxydation (KHALIL et al, 1998; KHALIL et al, 1996) ou bien de l'effet la diminution de leurs activités paraoxonase (SERES et al., 2004; MILOCHEVITCH et KHALIL, 2001).

In vitro, l'activité antioxydante des HDL est réduite chez les sujets diabétiques et chez les femmes postménopausées (GOWRI et al., 1999). Des modèles de souris obèses et dyslipidimiques ont corroborer cette observation (MERTENS et al., 2003). Toutes ces études suggèrent que la PON1 serait impliquée dans la diminution de la fonction anti-athérogène des HDL.

Étant donné que la réduction de l'activité paraoxonase au cours du vieillissement ne résulte pas d'une diminution de la concentration plasmatique de la PON1 ni de sa distribution phénotypique (SERES et al., 2004). La détermination des facteurs qui sont impliqués dans cette diminution ainsi que son impact sur ces propriétés antioxydantes est d'une importance majeure. Nous nous sommes donc intéressés à étudier les propriétés antioxydantes des HDL avec l'âge. D'autre part, nous avons étudié l'implication de la

PON1 dans l'augmentation de la susceptibilité à l'oxydation des lipoprotéines au cours du vieillissement.

Les résultats que nous avons obtenus montrent une diminution significative de l'activité antioxydante des HDL des sujets âgés (E-HDL) en comparaison avec les HDL des sujets jeunes (Y-HDL). Cette démonstration est faite en mesurant les DC et aussi le malondialdéhyde (MDA) selon la méthode de Agarwal (AGARWAL et CHASE, 2002).

La diminution de l'activité antioxydante des HDL avec l'âge est comparée à différentes concentrations en HDL (200, 400 et 600 μ g), l'activité antioxydante des Y-HDL dépend étroitement de leur concentration. Cette observation est en accord avec les résultats de Mackness et al. (MACKNESS et al., 1993). Cependant, aucune différence significative n'est observée dans le pourcentage de protection par les E-HDL à 400 μ g /ml et à 600 μ /ml (Figure 2). Ce qui suggère, qu'au cours du vieillissement, il y aurait une altération de tous les composés antioxydants dans les HDL suite à leur oxydation. En effet, ces résultats sont en accord avec l'hypothèse de Navab et al. qui propose que les HDL sont des lipoprotéines « caméléon » ayant des propriétés anti-inflammatoires à l'état basal mais qui peuvent se transformer en lipoprotéines pro-inflammatoires dans des conditions de stress aiguë (NAVAB et al., 2001).

Selon cette hypothèse, l'altération des propriétés anti-athérogènes des HDL est due au remplacement des protéines antioxydantes (Apo AI, PON1 et PAF-AH) par des protéines inflammatoires (ceruloplasmin et SAA) (Figure 8).

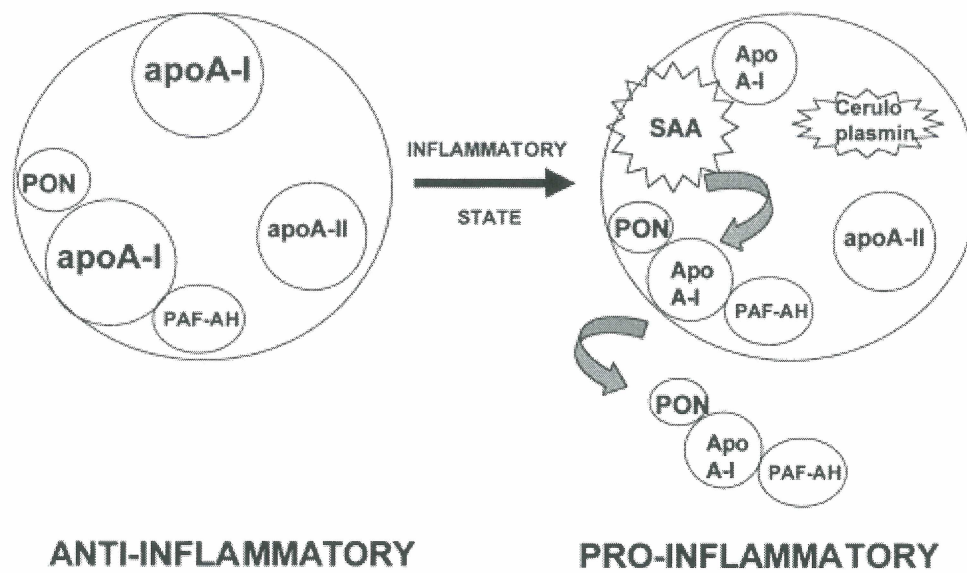


FIGURE 8: Altération de la composition des HDL dans les conditions du stress oxydatif tirée de VAN LENTEN et al. (2001)

L'association de l'activité antioxydante des HDL avec la PON1 a été démontrée par Shih et al. (SHIH et al., 1998). En effet, les souris PON1 knock out sont plus susceptibles à développer l'athérosclérose que les souris sauvages, et les HDL de ces souris ne protègent plus les LDL de l'oxydation.

Afin de mieux étudier l'effet de la diminution de l'activité paraoxonase au cours du vieillissement nous avons procédé à la purification de la PON1 à partir du plasma des sujets jeunes (Y-PON1) et âgés (E-PON1) selon la méthode décrite par Gan et al. (GAN et al., 1991). Nos résultats montrent une diminution de l'effet protecteur de la PON1 avec l'âge. En effet, la réduction de la production des DC dans les LDL est réduite de 48.78% en présence de E-PON1 versus 84.87% en présence de la Y-PON1. Tout récemment Teiber et al. (TEIBER et al. 2004) ont montré que la PON1 purifiée ne protège pas les LDL de l'oxydation initiée par les ions du cuivre, ils suggèrent que l'effet antioxydant de la PON1 purifiée selon la méthode de Gan et al. (GAN et al. 1991) observé dans les études ultérieures serait dû à l'effet du tergitol utilisé lors de la purification ou aux contaminations par d'autres protéines plasmatiques. Étant donné que dans notre étude les deux enzymes (Y-PON1 et E-PON1) ont été purifiées en présence de la même concentration de tergitol, la différence de l'effet antioxydant de la PON1 observée ne pouvait pas être associé au tergitol ni aux autres contaminants.

La PON1 utilisée à des concentrations physiologiques (80 μg / ml) protège beaucoup plus les LDL de l'oxydation que la vitamine E (50 μM α -tocophérol). Ces résultats permettent de démontrer que le potentiel antioxydant de la PON1 dépasse celui des autres antioxydants endogènes aux lipoprotéines. En effet, même si les HDL sont les lipoprotéines les moins riches en antioxydants (α -tocophérol, β carotène, lycopène) par

rapport aux VLDL et LDL, elles sont capables de protéger ces lipoprotéines de l'oxydation sous l'action des enzymes qui leurs sont associées notamment la PON1.

3.3 Rôle du groupement thiols de la cystéine 284 dans l'activité antioxydante de la PON1

Il a été suggéré que la protéine paraoxonase possède deux sites actifs, le premier contrôle son activité paraoxonase/arylesterase. Le second site implique le résidue cystéine en position 284 et est responsable de la protection des LDL contre l'oxydation (AVIRAM et al., 1998). On suppose que la diminution de l'activité antioxydante de la PON1 et des HDL au cours du vieillissement est le résultat de l'altération des fonctionnalités de ce site actif sous l'effet des ERO.

Lors de l'inactivation (par radiolyse gamma) de la PON1 purifiée, nous avons démontré une diminution significative de son activité paraxonase à partir de la dose de 1000 Gy (Figure 4a). L'oxydation de la PON1 in vitro induit une diminution de son activité enzymatique. Ceci est en accord avec nos résultats obtenus lors de l'oxydation des HDL in vitro (JAOUAD et al., 2003). De même, Aviram et al. (AVIRAM et al., 1998) ont démontré une altération de l'activité paraoxonase au cours de l'oxydation avec les ions du cuivre des deux phénotypes Q et R purifiés suivant la même méthode utilisée par notre groupe.

La PON1 purifiée à partir du plasma humain et de lapin présente un seul groupement sulfhydryl libre. Dans la PON1 native, la cystéine 284 représente le site actif de l'enzyme responsable de son activité antioxydante (SORENSEN et al., 1995). La mesure du nombre des groupements SH suite à l'oxydation de la PON1 à une dose de 1000 Gy montre une diminution significative de celui-ci (Figure 6).

L'activité antioxydante de la PON1 exposée aux radicaux libres produits par radiolyse gamma montre une diminution suivant le degré de l'oxydation (Figure 5). Ceci suggère qu'au cours de l'oxydation, l'altération du site actif de la PON1 ou des acides aminés qui le forment abolie sa capacité à protéger les LDL de l'oxydation. En effet, la PON1 perd sa capacité à inhiber l'oxydation des LDL lors du blocage du groupement SH de la cystéine en position 284 par le N-ethyl maleimide (NEM). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Aviram et al. qui ont utilisés des mutants de la PON1 où la cystéine en position 284 a été remplacée par l'alanine ou par la sérine montrant ainsi que la PON1 ne parvient plus à inhiber l'oxydation des LDL (AVIRAM et al., 1998).

La réduction des effets antioxydants de la PON1 et donc des HDL au cours du vieillissement serait donc le résultat de la diminution significative du nombre des groupements sulfhydrys de la paraoxonase1 (Figure 7). On conclut donc que l'effet antioxydant de la PON1 est dû en grande partie à son centre réducteur situé au niveau de la cysteine 284.

3.4 Conclusions et perspectives

En conclusion, ce projet nous a permis d'établir d'une part les liens entre l'oxydation des HDL et l'activité paraoxonase et d'autre part entre l'activité antioxydante de la PON1, son site actif et l'effet du vieillissement.

À notre connaissance, il s'agit de la première démonstration d'une diminution du potentiel antioxydant des HDL au cours du vieillissement. Les résultats montrent clairement que cette diminution est due à l'altération de l'activité paraoxonase avec l'âge. Nos résultats sont originaux par le fait qu'ils démontrent qu'une exposition de la PON1 in vitro aux radicaux libres produits par radiolyse gamma, engendre une

diminution de son contenu en groupements SH libres (Figure 6) et par conséquent une baisse de son activité antioxydante.

Étant donnée la complexité de l'étiologie de l'athérosclérose, il serait intéressant de déterminer le mécanisme de l'activité de l'enzyme PON1 dans l'hydrolyse des lipides oxydés accumulés dans les macrophages. Ainsi que l'effet de sa concentration et de son contenu en groupements SH sur l'activité antioxydante des HDL.

L'activité antioxydante des HDL dépend aussi de l'intégrité de leur structure et de leurs propriétés physico-chimiques. En effet, la diminution de la teneur en antioxydants vitaminiques et en stéroïdes endogènes dans les HDL avec l'âge (KHALIL et al., 2000) pourrait avoir des effets sur leur activité antioxydante. Il serait donc pertinent de déterminer la nature et le degré des modifications dans la composition des HDL (HDL2 et HDL3) au cours du vieillissement et d'étudier l'impact de ces modifications sur leurs propriétés antioxydantes.

Pour approfondir notre compréhension du rôle anti-athérogène des HDL, il serait intéressant d'étudier l'effet de l'oxydation des HDL sur les autres protéines antioxydantes, en particulier l'Apo-AI, le PAF-AH et La PON3. Il serait également important de déterminer l'effet antioxydant de ces protéines au cours du vieillissement et aussi d'analyser les produits d'hydrolyse des lipides oxydés par la PON1 et la PON3.

Une autre avenue serait d'étudier les antioxydants comme la vitamine E et la vitamine C apportés par l'alimentation, pour vérifier leurs implications dans la protection contre les effets du stress oxydatif dans les conditions du vieillissement.

D'un point de vue clinique, cette étude apporte des informations importantes qui permettent la compréhension de l'effet de l'âge sur l'augmentation de l'incidence des

MCV et donc d'entrevoir des applications pour l'enzyme PON1 dans la thérapie et la prévention de l'athérosclérose.

4. REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire du stress oxydatif, athérosclérose et système immunitaire au sein du Centre de recherche sur le vieillissement.

C'est sous la direction du Docteur Abdelouahed Khalil, professeur au département de physiologie et biophysique, que ce travail a été effectué. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Ses connaissances et ses conseils ont grandement contribué à ma formation, je voudrais aussi le remercier de m'avoir donné l'occasion de contribuer à la littérature scientifique et aussi de participer à de nombreux congrès tout au long de ma maîtrise.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Dre Isabelle Dionne et au Dr. Patrick Vermette, professeurs à l'université de Sherbrooke, pour avoir accepté d'évaluer ce travail de recherche.

Je tiens à remercier le Dre Hélène Payette et le Dr Tamàs Fülöp pour leur soutien et pour leur intérêt au déroulement de mon projet.

Je voudrais remercier Chantal Deguise pour son aide précieuse durant la purification de la paraoxonase, ainsi que Christelle Milochévitch de m'avoir initiée aux techniques du laboratoire. Je remercie le Dr Hicham Berrougui et Martin Cloutier pour leur collaboration durant la finalisation des mesures des groupements thiols de la paraoxonase. Je remercie également Marie-Noëlle Caron, Anis Larbi et tous les étudiants sur l'étage, pour l'ambiance sympathique qui a contribué au bon déroulement de ce travail.

J'exprime mes sincères remerciements au Dre Nadine Douziech et au Dr. Kevin Lenton, qui m'ont toujours fait part de leurs connaissances scientifiques.

Je remercie Mme Lucie Duquette et Mme Cécile Trochet ainsi que toutes les personnes au Centre de recherche sur le vieillissement qui m'ont encouragée.

Enfin, je n'oublierai pas de remercier chaleureusement mon père et tous mes frères et sœurs, en particulier mon frère Abdelatif et ma belle sœur Samira qui m'ont hébergée et supportée tout au long de mes études universitaires, merci pour tout mes chers. Merci à mon petit-neveu Karim pour la mitrailleuse intergalactique de bisous...! Un gros merci à ma sœur Bouchra qui m'a toujours soutenue dans les hauts comme dans les bas. Merci à tous mes amis.

5. RÉFÉRENCES

- Abbott, C. A., Mackness, M. I., Kumar, S., Boulton, A. J., & Durrington, P. N. (1995 Nov). Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15(11), 1812-8.
- Adkins, S., Gan, K. N., Mody, M., & La Du, B. N. (1993). Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet*, 52(3), 598-608.
- Agarwal, R., & Chase, S. D. (2002). Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 775(1), 121-6.
- Ahmed, Z., Ravandi, A., Maguire, G. F., Emili, A., Draganov, D., La Du, B. N., Kuksis, A., & Connelly, P. W. (2002). Multiple substrates for paraoxonase-1 during oxidation of phosphatidylcholine by peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun*, 290(1), 391-6.
- Ahmed, Z.; Babaei, S.; Maguire, G. F.; Draganov, D.; Kuksis, A.; La Du, B. N., and Connelly, P. W. Paraoxonase-1 reduces monocyte chemotaxis and adhesion to endothelial cells due to oxidation of palmitoyl, linoleoyl glycerophosphorylcholine. *Cardiovasc*. 2003 Jan; 57(1):225-31
- Aldridge, W. N. (1953a). Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J*, 53(1), 110-7.
- Aldridge, W. N. (1953b). Serum esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem J*, 53(1), 117-24.
- Aviram, M. (1999). Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease? *Mol Med Today*, 5(9), 381-6.
- Aviram, M., Billecke, S., Sorenson, R., Bisgaier, C., Newton, R., Rosenblat, M., Eroglu, J., Hsu, C., Dunlop, C., & La Du, B. (1998). Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18(10), 1617-24.
- Aviram, M., & Fuhrman, B. (1998). LDL oxidation by arterial wall macrophages depends on the oxidative status in the lipoprotein and in the cells: role of prooxidants vs. antioxidants. *Mol Cell Biochem*, 188(1-2), 149-59.

- Aviram, M., Hardak, E., Vaya, J., Mahmood, S., Milo, S., Hoffman, A., Billicke, S., Draganov, D., & Rosenblat, M. (2000). Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation*, 101(21), 2510-7.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Billecke, S., Eroglu, J., Sorenson, R., Bisgaier, C. L., Newton, R. S., & La Du, B. (1999). Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med*, 26(7-8), 892-904.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C. L., Newton, R. S., Primo-Parmo, S. L., & La Du, B. N. (1998). Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest*, 101 (8), 1581-90.
- Benzie, I. F. (1996). Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int J Food Sci Nutr*, 47(3), 233-61.
- Boren, J., Olin, K., Lee, I., Chait, A., Wight, T. N., & Innerarity, T. L. (1998). Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest*, 101(12), 2658-64.
- Castelli, W. P., Garrison, R. J., Wilson, P. W., Abbott, R. D., Kalousdian, S., & Kannel, W. B. (1986). Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA*, 256(20), 2835-8.
- Draganov, D. I., Stetson, P. L., Watson, C. E., Billecke, S. S., & La Du, B. N. (2000). Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem*, 275(43), 33435-42.
- el-Saadani, M., Esterbauer, H., el-Sayed, M., Goher, M., Nassar, A. Y., & Jurgens, G. (1989). A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. *J Lipid Res*, 30(4), 627-30.
- Esterbauer, H.; Striegl, G.; Puhl, H., and Rotheneder, M. (1989). Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun.*; 6(1):67-75.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., & Jurgens, G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*, 13(4), 341-90.

- Fang, Y. Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-9.
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-47.
- Furlong, C. E., Costa, L. G., Hassett, C., Richter, R. J., Sundstrom, J. A., Adler, D. A., Disteché, C. M., Omiecinski, C. J., Chapline, C., Crabb, J. W., & et, a. l. (1993). Human and rabbit paraoxonases: purification, cloning, sequencing, mapping and role of polymorphism in organophosphate detoxification. *Chem Biol Interact*, 87 (1-3), 35-48.
- Gan, K. N., Smolen, A., Eckerson, H. W., & La Du, B. N. (1991). Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos*, 19(1), 100-6.
- Garin, M. C., James, R. W., Dussoix, P., Blanche, H., Passa, P., Froguel, P., & Ruiz, J. (1997). Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest*, 99(1), 62-6.
- Gowri, M. S., Van der Westhuyzen, D. R., Bridges, S. R., & Anderson, J. W. (1999). Decreased protection by HDL from poorly controlled type 2 diabetic subjects against LDL oxidation may Be due to the abnormal composition of HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(9), 2226-33.
- Grainger, D. J., Kemp, P. R., Liu, A. C., Lawn, R. M., & Metcalfe, J. C. (1994). Activation of transforming growth factor-beta is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice. *Nature*, 370(6489), 460-2.
- Halliwell B, Gutteridge. JM. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. (1989) Oxford: Clarendon Press.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., & Cross, C. E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med*, 119(6), 598-620.
- Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R. B., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J. L., & Tawfik, D. S. (2004). Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol*, 11(5), 412-9.
- Jaouad, L., Milochévitch, C., & Khalil, A. (2003). PON1 paraoxonase activity is reduced during HDL oxidation and is an indicator of HDL antioxidant capacity. *Free Radic Res*, 37(1), 77-83.

- Josse, D., & Masson, P. (2001). [Human plasma paraoxonase (HuPON1): an anti-atherogenic enzyme with organophosphate hydrolase activity]. *Ann Pharm Fr*, 59(2), 108-18.
- Keaney, J. F. Jr. (2000). Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med*, 21(4-5), 99-166.
- Kelso, G. J., Stuart, W. D., Richter, R. J., Furlong, C. E., Jordan-Starck, T. C., & Harmony, J. A. (1994). Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry*, 33(3), 832-9.
- Khalil, A., Jay-Gerin, J. P., & Fulop, T. Jr. (1998). Age-related increased susceptibility of high-density lipoproteins (HDL) to in vitro oxidation induced by gamma-radiolysis of water. *FEBS Lett*, 435(2-3), 153-8.
- Khalil, A., Wagner, J. R., Lacombe, G., Dangoisse, V., & Fulop, T. Jr. (1996). Increased susceptibility of low-density lipoprotein (LDL) to oxidation by gamma-radiolysis with age. *FEBS Lett*, 392(1), 45-8.
- Khalil, A.; Fortin, J. P.; LeHoux, J. G., and Fulop, T. Age-related decrease of dehydroepiandrosterone concentrations in low density lipoproteins and its role in the susceptibility of low density lipoproteins to lipid peroxidation. *J Lipid Res*. 2000 Nov; 41(10):1552-61.
- Kuo, C. L. and La Du, B. N. Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity. *Drug Metab Dispos*. 1998 Jul; 26(7):653-60.
- La Du, B. N., Aviram, M., Billecke, S., Navab, M., Primo-Parmo, S., Sorenson, R. C., & Standiford, T. J. (1999). On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact*, 119-120, 379-88.
- Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, 407(6801), 233-41.
- Mackness, B., Durrington, P. N., Boulton, A. J., Hine, D., & Mackness, M. I. (2002). Serum paraoxonase activity in patients with type 1 diabetes compared to healthy controls. *Eur J Clin Invest*, 32(4), 259-64.
- Mackness, B., Durrington, P. N., & Mackness, M. I. (1998). Lack of protection against oxidative modification of LDL by avian HDL. *Biochem Biophys Res Commun*, 247(2), 443-6.
- Mackness, B., Hunt, R., Durrington, P. N., & Mackness, M. I. (1997). Increased immunolocalization of paraoxonase, clusterin, and apolipoprotein A-I in the human artery wall with the progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17(7), 1233-8.

- Mackness, M. I., Abbott, C., Arrol, S., & Durrington, P. N. (1993). The role of high-density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. *Biochem J*, 294 (Pt 3), 829-34.
- Mackness, M. I., & Durrington, P. N. (1995). HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis*, 115(2), 243-53.
- Marchioli, R., Schweiger, C., Levantesi, G., Tavazzi, L., & Valagussa, F. (2001). Antioxidant vitamins and prevention of cardiovascular disease: epidemiological and clinical trial data. *Lipids*, 36 Suppl, S53-63.
- Mazur A., (1946). An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates *J. Biol. Chem.* 164: 271-289.
- McElveen, J., Mackness, M. I., Colley, C. M., Peard, T., Warner, S., & Walker, C. H. (1986). Distribution of paraoxon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction. *Clin Chem*, 32(4), 671-3.
- Mertens, A., Verhamme, P., Bielicki, J. K., Phillips, M. C., Quarck, R., Verreth, W., Stengel, D., Ninio, E., Navab, M., Mackness, B., Mackness, M., & Holvoet, P. (2003). Increased low-density lipoprotein oxidation and impaired high-density lipoprotein antioxidant defense are associated with increased macrophage homing and atherosclerosis in dyslipidemic obese mice: LCAT gene transfer decreases atherosclerosis. *Circulation*, 107(12), 1640-6.
- Milochevitch, C., & Khalil, A. (2001). Study of the paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase activities with aging. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 65(5-6), 241-6.
- Moslen, M. T. (1994). Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. *Adv Exp Med Biol*, 366, 17-27.
- Mueller, R. F., Hornung, S., Furlong, C. E., Anderson, J., Giblett, E. R., & Motulsky, A. G. (1983). Plasma paraoxonase polymorphism: a new enzyme assay, population, family, biochemical, and linkage studies. *Am J Hum Genet*, 35(3), 393-408.
- Navab, M., Berliner, J. A., Subbanagounder, G., Hama, S., Lusis, A. J., Castellani, L. W., Reddy, S., Shih, D., Shi, W., Watson, A. D., Van Lenten, B. J., Vora, D., & Fogelman, A. M. (2001). HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21(4), 481-8.

- Navab, M., Hama-Levy, S., Van Lenten, B. J., Fonarow, G. C., Cardinez, C. J., Castellani, L. W., Brennan, M. L., Lusis, A. J., Fogelman, A. M., & La Du, B. N. (1997). Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J Clin Invest*, 99(8), 2005-19.
- Parthasarathy, S., Barnett, J., & Fong, L. G. (1990). High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta*, 1044(2), 275-83.
- Parthasarathy, S., Wieland, E., & Steinberg, D. (1989). A role for endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(3), 1046-50.
- Primo-Parmo, S. L., Sorenson, R. C., Teiber, J., & La Du, B. N. (1996). The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics*, 33(3), 498-507.
- Ross, R. (1999a). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340(2), 115-26.
- Ross, R. (1999b). Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*, 138(5 Pt 2), S419-20.
- Sattler, W., Christison, J., & Stocker, R. (1995). Cholesterylester hydroperoxide reducing activity associated with isolated high- and low-density lipoproteins. *Free Radic Biol Med*, 18(3), 421-9.
- Seres, I., Paragh, G., Deschene, E., Fulop, T. Jr, & Khalil, A. (2004). Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. *Exp Gerontol*, 39(1), 59-66.
- Shih, D. M., Gu, L., Xia, Y. R., Navab, M., Li, W. F., Hama, S., Castellani, L. W., Furlong, C. E., Costa, L. G., Fogelman, A. M., & Lusis, A. J. (1998). Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*, 394(6690), 284-7.
- Smolen, A., Eckerson, H. W., Gan, K. N., Hailat, N., & La Du, B. N. (1991). Characteristics of the genetically determined allozymic forms of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug Metab Dispos*, 19(1), 107-12.
- Sorenson, R. C., Bisgaier, C. L., Aviram, M., Hsu, C., Billecke, S., & La Du, B. N. (1999). Human serum Paraoxonase/Arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids : apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(9), 2214-25.

- Sorenson, R. C., Primo-Parmo, S. L., Kuo, C. L., Adkins, S., Lockridge, O., & La Du, B. N. (1995). Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(16), 7187-91.
- Stampfer, M. J., Sacks, F. M., Salvini, S., Willett, W. C., & Hennekens, C. H. (1991). A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*, 325(6), 373-81.
- Steinberg, D. (1997). Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem*, 272(34), 20963-6.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Crew TE, Khoo JC, Witztum JL (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320: 915-924.
- Stephens, N. G., Parsons, A., Schofield, P. M., Kelly, F., Cheeseman, K., & Mitchinson, M. J. (1996). Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*, 347(9004), 781-6.
- Teiber, J. F.; Draganov, D. I., and La Du, B. N. Purified human serum PON1 does not protect LDL against oxidation in the in vitro assays initiated with copper or AAPH. (2004 Sep 1) *J Lipid Res*.
- Thomas, M. J., Thornburg, T., Manning, J., Hooper, K., & Rudel, L. L. (1994). Fatty acid composition of low-density lipoprotein influences its susceptibility to autooxidation. *Biochemistry*, 33(7), 1828-34.
- Van Lenten, B. J., Navab, M., Shih, D., Fogelman, A. M., & Lusis, A. J. (2001). The role of high-density lipoproteins in oxidation and inflammation. *Trends Cardiovasc Med*, 11(3-4), 155-61.
- Van Lenten, B. J., Wagner, A. C., Navab, M., & Fogelman, A. M. (2001). Oxidized phospholipids induce changes in hepatic paraoxonase and ApoJ but not monocyte chemoattractant protein-1 via interleukin-6. *J Biol Chem*, 276(3), 1923-9.
- Watson, A. D., Berliner, J. A., Hama, S. Y., La Du, B. N., Faull, K. F., Fogelman, A. M., & Navab, M. (1995a). Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest*, 96(6), 2882-91.
- Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, 54(3), 176-86.
- Young, S. G., & Parthasarathy, S. (1994). Why are low-density lipoproteins atherogenic? *West J Med*, 160(2), 153-64.